



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA  
FARINHA DE CASCA DE MANDIOCA NA OBTENÇÃO DE  
ACETATO DE ETILA COM O MICRORGANISMO *Ceratocystis  
fimbriata*.**

**Kyzzes Barreto Araujo**

**São Cristovão - Sergipe**

**2016**



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Universidade Federal de Sergipe**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA  
FARINHA DE CASCA DE MANDIOCA NA OBTENÇÃO DE  
ACETATO DE ETILA COM O MICRORGANISMO *Ceratocystis  
fimbriata*.**

**KYZZES BARRETO ARAUJO**

Tese apresentada como requisito  
para a obtenção do título de Doutor  
em Biotecnologia com ênfase na  
área de Biotecnologia Industrial.

**ORIENTADOR:**

Prof. Dr. Roberto Rodrigues de  
Souza – Departamento de  
Engenharia Química, UFS.

**Área de Concentração:**  
Biotecnologia Industrial.

**São Cristóvão - Sergipe**

**2016**

**CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Araujo, Kyzzes Barreto  
A663a Avaliação do potencial biotecnológico da farinha de casca de mandioca na obtenção de acetato de etila com microrganismo *Ceratocystis fimbriata* / Kyzzes Barreto Araujo; orientador Roberto Rodrigues de Souza. – São Cristóvão, 2016.  
121 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

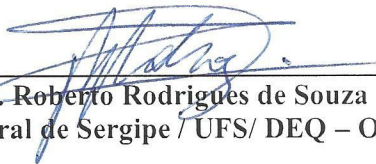
1. Fermentação. 2. Mandioca. 3. Esteres. 4. *Ceratocystis fimbriata*. I. Souza, Roberto Rodrigues de, orient. II. Título.

CDU 606:633.493

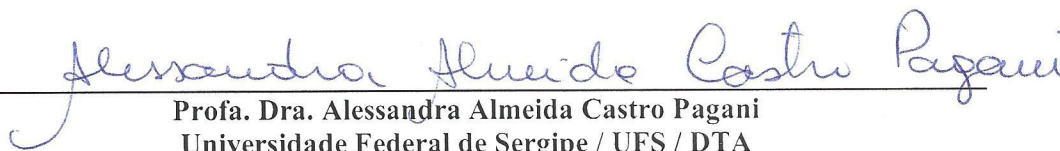
KYZZES BARRETO ARAUJO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA FARINHA  
DE CASCA DE MANDIOCA NA OBTENÇÃO DE ACETATO DE  
ETILA COM O MICRORGANISMO *Ceratocystis fimbriata*.**

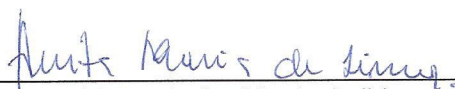
Tese de Doutorado apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia, na área de concentração em Biotecnologia Industrial, na linha de pesquisa de Bioprocessos no Ponto Focal de Sergipe na Universidade Federal de Sergipe como um dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, aprovada pela Banca Examinadora em 25 de fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza  
Universidade Federal de Sergipe / UFS / DEQ – Orientador



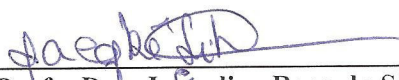
Prof. Dra. Alessandra Almeida Castro Pagani  
Universidade Federal de Sergipe / UFS / DTA



Prof. Dra. Anita Maria de Lima  
Universidade Federal de Sergipe / UFS / PPDOC-CAPES/FAPITEC / PRODEMA



Prof. Dr. Gabriel Francisco da Silva  
Universidade Federal de Sergipe / UFS / NUPETRO



Prof. Dra. Jaqueline Rego da Silva Rodrigues  
Universidade Federal de Sergipe / UFS / DEQ

**Dedico aos meus pais, amor maior, que sempre me envolveram de amor, carinho e coragem, que sempre me apoiaram nesta longa batalha.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde, força, paciência e sabedoria além de ter me abençoado com meus anjos amigos que me auxiliaram para a realização deste trabalho e me confortavam com palavras de incentivo.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo para que eu chegasse até aqui, todo o apoio incondicional para que nos momentos de cansaço e dúvida, retomasse a luta. O companheirismo de vocês me torna forte.

Ao meu irmão pelo amor e carinho, por todos os momentos de amizade e diversão. Meu exemplo de amigo leal.

A minha grande amiga e irmã Rafaela, pela amizade, lealdade, pelo apoio naqueles momentos de choros e angústia. Muito obrigada por sua orientação repleta de carinho e preocupação amizade. Agradeço a Deus por ter colocado esse anjo no meu caminho, durante todos esses anos de amizade.

A minha nova amiga encontrada nessa fase da vida, Claudenia Pereira, mais um anjo enviado, que sempre esteve disposta a ajudar e que sempre me ajudava no laboratório, orava por mim e pelo sucesso deste trabalho. Muito Obrigada! Torço por você.

A professora Flaviana Damasceno muito disposta ajudar e que deu um grande direcionamento para execução deste trabalho.

Ao orientador Professor Roberto Rodrigues, pelo apoio, confiança e compreensão durante a realização deste trabalho.

A Anita por ter me dado um apoio especial na execução dos artigos me orientando da melhor forma a valorizar os resultados e enriquecendo de novas informações a minha vida acadêmica.

Ao Professor Gabriel Francisco da Silva e aos amigos conquistados do LTA por todo o suporte prestado para o desenvolvimento deste trabalho e pelas semanas de trabalho árduo que foram compensadas com sorrisos, simpatia e alegria.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| INDICE DE FIGURAS.....                      | IX  |
| INDICE DE TABELAS.....                      | XII |
| RESUMO .....                                | XIV |
| ABSTRACT.....                               | XV  |
| INTRODUÇÃO GERAL.....                       | 15  |
| OBJETIVOS.....                              | 18  |
| Objetivo Geral.....                         | 18  |
| Objetivos Específicos.....                  | 18  |
| CAPÍTULO 1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....      | 19  |
| 1- Aproveitamento de resíduos.....          | 19  |
| 1.1- Mandioca.....                          | 21  |
| 2- Bioaromas.....                           | 23  |
| 3- Compostos Voláteis.....                  | 28  |
| 4- Acetato de etila.....                    | 32  |
| 5- Mercado de Aromas.....                   | 38  |
| 6- Fermentação em estado sólido.....        | 41  |
| 7- Microrganismos produtores de aromas..... | 50  |
| 7.1- <i>Ceratocystis fimbriata</i> .....    | 52  |
| REFERÊNCIAS .....                           | 54  |

|  |            |
|--|------------|
| <b>INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS 2, 3 E PATENTE.....</b>  | <b>70</b>  |
| <b>CAPÍTULO 2- ARTIGO - Biotechnological process in solid state for production the ethyl acetate flavour using cassava rind flour as substrate.....</b>  | <b>72</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>72</b>  |
| <b>KEYWORDS.....</b>   | <b>72</b>  |
| 1- Introduction.....   | 73         |
| 2- Material and Methods.....   | 74         |
| 3- Results and Discussion.....   | 76         |
| 4- Conclusion.....   | 91         |
| 5- References.....   | 92         |
| <b>CAPÍTULO 3- ARTIGO - Evaluation of ethyl acetate recovery using NaCl with direct application in study of increase scale through the fermentative process in state solid.....</b>  | <b>95</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>KEYWORDS.....</b>   | <b>95</b>  |
| 1- Introduction.....   | 96         |
| 2- Material and Methods.....   | 97         |
| 3- Results and Discussion.....   | 99         |
| 4- Conclusion.....   | 107        |
| 5- References.....   | 108        |
| <b>CAPÍTULO 4- PATENTE - Processo biotecnológico em estado sólido para a obtenção do aroma acetato de etila utilizando o microrganismo <i>Ceratocystis fimbriata</i> e aproveitando a farinha de casca de mandioca como substrato.....</b> | <b>110</b> |
| 1- Comprovante de depósito de pedido de patente junto ao INPI.....   | 110        |
| 2- Relatório Descritivo.....   | 111        |
| 3- Figuras.....  | 115        |
| 4- Reivindicações.....   | 116        |
| 5- Resumo.....   | 118        |



|  |            |
|--|------------|
| <b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>                  | <b>119</b> |
| <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b> | <b>121</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Farinha da casca de mandioca. (Fonte: Autora, 2015).....   | 22 |
| <b>Figura 2:</b> Via metabólica da glicose (Glicólise).....   | 34 |
| <b>Figura 3:</b> Vias metabólicas propostas para a produção de acetil-CoA.....  | 35 |
| <b>Figura 4:</b> Participação do mercado global de Aromas e Sabores (Fonte: Lucientel, 2013; Análise Bain e Company Gas Energy, 2014).....                          | 39 |
| <b>Figura 5:</b> Fermentação em estado sólido da farinha da casca de mandioca (Fonte: Autora, 2015).....  | 42 |
| <b>Figura 6:</b> Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos (HÖLKER e LENZ, 2005).....  | 47 |
| <b>Figura 7:</b> (A) <i>Ceratocystis fimbriata</i> visto no microscópio (20x); (B) <i>Ceratocystis fimbriata</i> cultivado em placa de petri no meio Sabouroud..... | 52 |

### CAPÍTULO 2- Biotechnological process in solid state for production the ethyl acetate compound using cassava rind flour as substrate.

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1:</b> Pareto chart of effects for the $2^2$ experimental design with cassava rind flour.....   | 78 |
| <b>Figure 2:</b> Response Surface for the $2^2$ experimental design with cassava rind flour...  | 80 |
| <b>Figure 3:</b> (A) Kinetics of production of ethyl acetate, moisture and consumption of total sugars produced in cassava rind flour in SSF test 6 (64, 1%; 10 g). (B) Kinetics of production of ethyl acetate, moisture and consumption of total sugars produced in cassava rind flour in SSF test 8 (50%; 14, 23 g)..... | 81 |
| <b>Figure 4:</b> (A) Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 6 (64, 1%; 10 g). (B) Chromatogram   |    |

production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 8 (50%; 14, 23 g).....83

**Figura 5:** (A) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour ensaio 6 (64,1% - 10g). (B) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour ensaio 8 (50% - 14,23g)..... 85

**Figura 6:** (A) Kinetics of moisture behavior and consumption of total and reducers sugars produced in cassava rind flour in SSF test 1 (40%; 7g). (B) Kinetics of moisture behavior and consumption of total and reducers sugars produced in cassava rind flour in SSF test 5 (35, 9%; 10 g)..... 87

**Figura 7:** (A) Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 1 (40%; 7g). (B) Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 5 (35,9%; 10 g)..... 88

**Figura 8:** (A) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour ensaio 1 (40%; 7g). (B) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour ensaio 5 (35,9%; 10 g)..... 89

### **CAPÍTULO 3 - Evaluation of ethyl acetate recovery using nacl with direct application in study of increase scale through the fermentative process in state solid.**

**Figura 1:** Recovery of ethyl acetate with different concentrations of NaCl..... 100

**Figure 2:** Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF erlenmeyers 250 ml without salt (2A), 250 ml with 30% salt (2B).....101

**Figure 3:** Ethyl acetate production in different erlenmeyers and quantity of the inoculums.....103

**Figure 4:** Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF erlenmeyers 1000 ml – 10% (4A), 1000 ml – 20% (4B), 1000 ml – 30% (4C) e 2000 ml – 50% (4D).....105

**CAPÍTULO 4 – “Processo biotecnológico em estado sólido para a obtenção do aroma acetato de etila utilizando o microrganismo *Ceratocystis fimbriata* e aproveitando a farinha de casca de mandioca como substrato”.**

**Figura 1:** Esquema de produção do acetato de etila para farinha da casca de mandioca através da fermentação em estado sólido..... **115**

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> Propriedades físicas e químicas do acetato de etila (AcOEt).....                         | <b>33</b> |
| <b>Tabela 2:</b> Aplicação da FES em diferentes setores industriais.....                                  | <b>42</b> |
| <b>Tabela 3:</b> Principais microrganismos utilizados na fermentação em estado sólido.....                | <b>44</b> |
| <b>Tabela 4:</b> Comparativo entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....               | <b>48</b> |
| <b>Tabela 5:</b> Aplicação da fermentação em estado sólido em diferentes substratos e microrganismos..... | <b>49</b> |
| <b>Tabela 6:</b> Relação de diferentes micro-organismos na produção de aromas.....                        | <b>51</b> |
| <b>Tabela 7:</b> Classificação taxonômica do <i>C.fimbriata</i> .....                                     | <b>53</b> |

### CAPÍTULO 2- Biotechnological process in solid state for production the ethyl acetate flavour using cassava rind flour as substrate.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Table 1:</b> Design matrix central composite rotational employed in the study of the production of ethyl acetate by Solid state fermentation..... | <b>75</b> |
| <b>Table 2:</b> Compositions of cassava rind flour.....  | <b>76</b> |
| <b>Table 3:</b> Values obtained from experimental design for solid state fermentation in 48 hours of fermentation.....                               | <b>77</b> |
| <b>Table 4:</b> Regression coefficient for ethyl acetate production in cassava rind flour.....   | <b>78</b> |
| <b>Table 5:</b> ANOVA for ethyl acetate production in cassava rind flour.....  | <b>79</b> |

**CAPÍTULO 3 - Evaluation of ethyl acetate recovery using NaCl with direct application in study of increase scale through the fermentative process in state solid.**

**Table 1:** Values of ethyl acetate productivity related to inoculum rate and container volume.....**102**

## RESUMO

Uma das formas promissoras para o aproveitamento de resíduos é através do desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, como por exemplo, a produção de bioaromas. O fungo *Ceratocystis fimbriata* tem potencial para síntese de ésteres produzindo variedades de compostos de aromas, como o acetato de etila, responsável por umas diversidades de aromas de frutas. O objetivo deste trabalho foi aproveitar e avaliar o potencial biotecnológico da casca de mandioca, um dos resíduos agroindustriais mais produzidos no estado de Sergipe, para produção de acetato de etila através da fermentação em estado sólido. Todo o procedimento realizado obedeceu a um planejamento experimental de onze experimentos que corresponde um planejamento experimental 2<sup>2</sup> ensaios acrescidos de 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, tendo como variáveis a massa da amostra e o teor de umidade. O composto volátil acetato de etila foi quantificado através da análise de headspace no cromatógrafo a gás e foi detectado que o melhor experimento para produção do acetato de etila foi (91,92  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) com 50% de umidade e 14,23 g de massa seca durante 48 horas de fermentação. A partir do melhor resultado obtido foi realizado outra fermentação para separação do aroma utilizando NaCl numa concentração de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% e 35%. Foi observado que a concentração de NaCl de 30% obteve melhor valor (3303,60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Com este resultado, foi realizado um aumento de escala para verificar a influência da produção do composto acetato de etila numa maior área superficial onde os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 1000 ml (10%, 20%, 30% de quantidade de inóculo) e 2000 ml (50% de quantidade de inóculo). A análise cromatográfica detectou que a solução salina de 30% recuperou melhor o acetato de etila no erlenmeyer de 1000 ml com 30% de inóculo (19,38  $\mu\text{mol. L}^{-1}$ ).

## ABSTRACT

One of the promising ways for the residues utilization is through the development of biotechnological processes for the production of a large number of metabolites of industrial interest, such as the production of bioaromas. The fungus *Ceratocystis fimbriata* has the potential to synthesis of esters producing varieties of flavor compounds such as ethyl acetate, responsible for a diversity of fruit flavors. The objective this work was utilize and evaluate the biotechnological potential of cassava rind, one of the agro-industrial waste more produced in the Sergipe state, for the production of ethyl acetate through the solid state fermentation. All procedure performed obeyed an experimental design of eleven experiments corresponding to an experimental design  $2^2$  trials plus 4 axial points and three repetitions at the central point, with the variable sample mass and moisture content. The volatile compound ethyl acetate was quantified by headspace analysis on a gas chromatograph and it was found that the best experiment for the production of ethyl acetate was (91,92  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) with 50% humidity and 14:23 g weight dried for 48 hours fermentation. As of the best result was done other fermentation for separating the aroma using NaCl at a concentration of 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% and 35%. It was observed that NaCl concentration of 30% obtained best value (3303,60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). This result has been done an increased scale to verify the influence of producing the compound ethyl acetate in a larger surface area where the experiments were performed in 1000 ml Erlenmeyer flask (10%, 20%, 30 % of the quantity of inoculum) and 2000 ml Erlenmeyer flask (50% of the quantity of inoculum). Chromatographic analysis found that 30% of saline best recovered the ethyl acetate in a 1000 ml Erlenmeyer flask with 30% inoculum (19,38  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).



## INTRODUÇÃO GERAL

O mercado agrícola brasileiro se destaca como um dos principais produtores e exportadores de produtos agropecuários e revela sua capacidade de responder às oportunidades ditadas pela crescente demanda por alimentos, impulsionada principalmente pelo aumento de renda dos países emergentes e em desenvolvimento. Estudos da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE) e da Agência das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) apontam crescimentos, entre 15% e 40%, na demanda mundial por diversos tipos de alimentos no período entre 2007/09 e 2019. (MAPA, 2013).

Os principais produtos mais produzidos na agricultura brasileira são a soja, milho, cana-de-açúcar, café, mandioca e diversas frutas, sendo que esta se notabiliza como uma das atividades mais importantes do agronegócio no Brasil para exportação, especialmente na Região Nordeste, mediante a participação dos seus polos irrigados, tornando-a principal região produtora e exportadora de frutas frescas do Brasil, sobretudo as frutas tropicais como melão, manga, banana, uvas, limão e melancia (Bezerra, 2014; Lopes *et al.*, 2009).

O Estado de Sergipe possui economia essencialmente agropecuária, gerando quantidades significativas de resíduos, os quais representam um problema ambiental. Atualmente, destaca-se na produção de fibra de coco verde, que são amplamente produzidas e de difícil degradação, e também é considerado o quarto produtor de citros, com uma produção de aproximadamente 840 mil toneladas de frutos (IBGE, 2014).

A cultura da mandioca é muito importante em Sergipe porque é considerada uma alternativa econômica de exploração agrícola em pequenas propriedades familiares. O Estado possui cerca de 98% da área colhida com mandioca localizada em diversas propriedades e cerca de 80% da produção de mandioca é para o consumo humano, no entanto os resíduos desses produtos agroindustriais são conseqüentemente, produzidos em larga escala causando problema de acúmulo no volume de lixo depositado no meio ambiente (Macedo, 2005; Graminha *et al.*, 2007, IBGE, 2014)

Alguns autores ressaltam que os resíduos de vegetais podem conter um alto nível de vitaminas, sais minerais e componentes bioativos, e assim vários pesquisadores brasileiros vêm estudando o aproveitamento de resíduos de frutas em diferentes alimentos como componentes enriquecedores além de contribuir com a diminuição

de impactos ambientais, estes subprodutos podem gerar renda colaborando com a economia do país. Uma das formas promissoras para o aproveitamento de resíduos é através do desenvolvimento de processos biotecnológicos que oferece inúmeras alternativas para a obtenção de produtos de maior valor agregado como ácidos orgânicos, biopesticidas biocombustíveis, enzimas e compostos aromáticos (Medeiros *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2014).

Segundo a Resolução nº 104 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aromas são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos, e podem ser classificados em: sintéticos ou naturais. Os aromas sintéticos são compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal ou vegetal utilizado por suas propriedades aromáticas e os aromas naturais são obtidos a partir de matéria primas naturais, como produtos de origem natural ou vegetal que possuam substâncias odoríferas em seu estado natural ou após uma fermentação, cocção, enriquecimento, entre outros e que são adquiridos através de métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos (ANVISA, 1999).

O interesse por aromas naturais conduziu um aumento de pesquisas concentrada em bioaromas. Pesquisas têm sido realizadas para a produção de bioaromas tais como o uso de resíduos da agroindústria do café para produção de aromas de frutas por *Ceratocystis fimbriata* (Soccol *et al.*, 2003); polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana para produção de aromas frutais por *Ceratocystis fimbriata* (Rossi *et al.*, 2009), bagaço de mandioca para produção de aromas frutais utilizando *Kluyveromyces marxianus* (Medeiros *et al.*, 2000), pó da casca de coco verde para produção de aroma de coco utilizando fungo *Trichoderma harzianum* (Ramos *et al.*, 2009), bagaço de cana para produção de aroma de coco por *Trichoderma harzianum* (Calasans, 2012), manipueira para a produção de aromas frutais utilizando *Geotrichum fragrans* (Damasceno *et al.*, 2003), mistura de suco de uva para produção de compostos voláteis através de *Kloeckera apiculata* e *Candida pulcherrima* (Zohre *et al.*, 2002), mosto de uva produzindo odor característicos de rosas através da *Kluyveromyces marxianus* (Garavaglia, 2006) e através da fermentação submersa produção de acetoína por *Hanseniaspora guiliermondii* utilizando glicose com fonte de carbono (Bergamo *et al.*, 2010) entre outros.

O processo fermentativo para a produção de aromas geralmente é conduzida em meio sólido devido às várias vantagens associadas a esse processo, como a recuperação do produto mais concentrado, menor geração de resíduos, menor consumo de água, possibilidade da utilização de subprodutos agroindustriais de menor custo, além de ser vantajoso quando se cultiva fungos filamentosos na obtenção desses metabólitos, já que as condições desse processo se assemelham às condições de vida natural destes microrganismos (Soccol e Vandenberghe, 2003; Ramos *et al.*, 2009; Rossi, 2011).

Neste contexto, visando a avaliar o potencial biotecnológico dos resíduos agroindustriais esta pesquisa tem como objetivo principal avaliar a produção de acetato de etila através da fermentação em estado sólido com o intuito de aplicar em processos industriais, oferecer à população um produto natural com custo reduzido, além de minimizar possíveis impactos ambientais que poderiam ser provocados pelos resíduos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial biotecnológico do resíduo da casca de mandioca para a produção de acetato de etila utilizando o fungo *Ceratocystis fimbriata* através da fermentação em estado sólido.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar físico-quimicamente a farinha da casca de mandioca;
- Estudar a cinética da produção de aromas;
- Estudar o efeito do crescimento celular em diferentes condições operacionais de processamento como umidade e quantidade de suporte utilizado;
- Recuperar e analisar os compostos voláteis produzidos pelo aroma;
- Analisar a produtividade do aroma.
- Realizar um estudo de aumento de escala

## **CAPÍTULO 1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **1- Aproveitamento de resíduos**

A população mundial cresceu desordenadamente nas últimas décadas juntamente com o desenvolvimento tecnológico, proporcionando um desequilíbrio ambiental com o aumento da produção de resíduos sólidos, excelentes substratos, rico em açúcares e fibras, com um alto valor nutricional agregado tais como palhas, cascas, caules, pedúnculos, madeiras de coníferas e folhosas, resíduos de indústrias de polpa (Rosa *et al.*, 2011).

A inutilidade desses resíduos representam perdas de biomassa e de nutrientes, no entanto, poderia ser utilizado como fontes alternativas de compostos bioativos agregando valores aos produtos finais, uma vez que o tratamento, transporte e a disposição final dos resíduos influencia diretamente o custo do processo (Nunes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014).

A indústria de alimentos, principalmente a de processamento de frutas, produz uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, como casca, sementes e bagaço, durante todo o seu processamento, resultando perdas e ocasionando inúmeros problemas ambientais. Dependendo do tipo da fruta processada esses resíduos possuem em sua composição vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes importantes para as funções fisiológicas. Estima-se que sejam gerados 30 a 40% de resíduos agroindustriais do total de frutas processadas (Sousa *et al.*, 2011).

A quantidade de resíduos gerados pela indústria de alimentos no Brasil é de aproximadamente 250 milhões de toneladas/ano devido o seu grande potencial de produção de recursos renováveis, podendo ter uma finalidade mais benéfica ao homem e ao meio ambiente gerando produtos com relevantes aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos (Tamanini *et al.*; 2004; Nascimento *et al.*, 2015).

No estado de Sergipe a produção de coco representa importante fonte de renda para muitos produtores, ocupando aproximadamente 42.000 mil ha, dos quais 80% estão localizados em área de baixada litorânea e tabuleiros costeiros o que acaba acontecendo o descarte incorreto das cascas em aterros sanitários ou até nos rios. Trabalhos de beneficiamento da casca de coco têm sido realizados, transformando esses resíduos em fibras naturais que são utilizadas na fabricação de vasos parecidos com os

de xaxim, vassouras e material de jardinagem (CODEVASF, 2009; Martins *et al.*, 2011).

É de fundamental importância uma seleção adequada do substrato para obtenção do metabólito de interesse durante a fermentação. Tem havido uma tendência crescente para utilização de resíduos agro-industriais em bioprocessos como polpa e casca de café, bagaço de mandioca, cana de açúcar, por serem substratos sólidos rico em fonte de carbono caracterizado pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares (Medeiros *et al.*, 2000; Santana, 2012).

O uso de resíduos agroindustriais juntamente com as inovações biotecnológicas resulta na produção de vários compostos químicos de interesse industrial como etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma, além de auxiliar na solução de excesso de disposição destes substratos (Medeiros *et al.*, 2000).

Como a preocupação com o meio ambiente é um tema bastante discutido atualmente, pesquisas são realizadas constantemente buscando desenvolver tecnologias capazes de diminuir a geração de resíduos e seu tratamento. E conclui-se que a biotecnologia vem sendo bastante promissora por ser uma técnica aplicada nesses resíduos orgânicos sólidos ou líquidos, adequando-os as exigências legais e as normas de qualidade ambiental, baseada na utilização de microrganismos e plantas com potencial de degradação de matéria orgânica (Silva *et al.*, 2014).

Dessa forma, o uso de resíduos agroindustriais em bioprocessos vem sendo bastante utilizado já que esses materiais são produzidos em grande quantidade e apresentam enorme potencial para bioconversão de produtos de interesse industrial. Os resíduos mais aproveitados para bioconversão são bagaço de cana de açúcar (Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011); bagaço de maçã (Christen *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2000; Dhillon *et al.*, 2011; Aggelopoulos *et al.*, 2014) farelo de trigo (Damaso *et al.*, 2008; Nizamunddi *et al.*, 2008) soro de leite (Aggelopoulos *et al.*, 2014) bagaço de mandioca (Brasmorski *et al.*, 1998; Christen *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2001; Damasceno *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006); polpa e casca de café (Soares *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2003; Medeiros

*et al.*, 2006; Orozco *et al.*, 2008); casca de arroz (Nizamuddi *et al.*, 2008; Onofre *et al.*, 2012).

### **1.1- Mandioca e subprodutos do seu processamento**

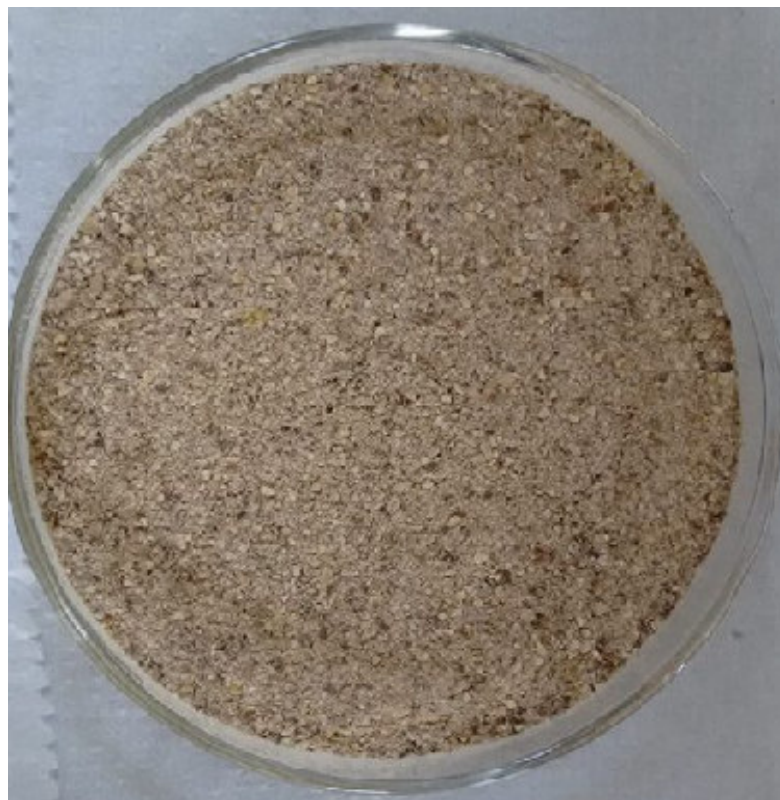
A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), também conhecida por aipim e macaxeira, é uma das culturas mais difundidas no Brasil e um dos principais alimentos de milhões de pessoas de países tropicais. É um produto que desempenha um papel importante no regime nutricional, especialmente entre as classes mais populares, devido ao seu alto valor energético. Além de ser uma matéria prima útil para inúmeros produtos contribuindo para geração de emprego e de renda (Vilhalva *et al.*, 2011).

O Brasil corresponde ao segundo maior país produtor da mandioca, a estimativa de produção da mandioca para 2014 é de 22.654.996 de toneladas, queda de 3,1% em relação ao mês anterior, devido à redução de 4,5% na área a ser colhida, apesar do crescimento de 1,5% no rendimento médio. Os maiores registros são nos estados do Pará, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Maranhão e se concentra, na sua grande maioria, em pequenas propriedades rurais que utilizam as raízes da planta para a produção de farinha e fécula, aproximadamente 83% das raízes de mandioca são destinadas a esta produção. No Estado de Sergipe a área colhida foi de 28.738 ha, atingindo uma produção de 433.723 toneladas (Vilhalva *et al.*, 2011; Faria *et al.*, 2011; IBGE, 2014).

No entanto é gerador de resíduos poluentes quando não tratados de forma adequada, dentre estes resíduos destaca-se os poluentes sólidos, como as cascas (periderme e entrecasca) e a massa fibrosa ou bagaço (córtex e parênquima de armazenamento de amido), e poluente líquido (manipueira) gerados da extração da fécula ou da farinha, que é altamente prejudicial ao meio ambiente quando depositada sem tratamento em leitos de rios ou lençóis freáticos causando sérios impactos ambientais (Wosiacki *et al.*, 2002; Felipe *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011).

Não se sabe ao certo a quantidade total de resíduos produzidos a partir da industrialização da mandioca, mas cerca de 10% da mandioca total utilizada na fabricação de farinha é eliminada na forma de casca, como mostra na Figura 1, que na forma desidratada apresenta 58,1% de amido, 3,4% de proteína bruta e 28,6% de fibra em detergente neutro. Devido o valor calórico e a digestibilidade do amido da mandioca

ser relativamente elevados, estes resíduos são utilizados como ração animal no tratamento de animais ruminantes como gado leiteiro e de corte (Caldas Neto *et al.*; 2000; Ferreira *et al.*;2011; Santana, 2012).



**Figura 1:** Farinha da casca de mandioca. Fonte: (Autora, 2015).

Mas, existem algumas limitações para a utilização dos resíduos da mandioca. Uma delas é a concentração acentuada na casca e entrecasca do que na polpa dos glicocianetos que sob a ação das enzimas betaglicosidase e hidroxinitrila liase liberam o ácido cianídrico. É importante que antes desses resíduos forem utilizados diretamente como ração, eles sejam submetidos ao sol ou a uma secagem elétrica a fim de eliminar parte do ácido cianídrico, que é volátil a temperatura de 26° C, evitando problemas de toxidez no trato animal (Ferreira *et al.*, 2011).

A utilização dessas fontes alimentares alternativas de menor custo é bastante promissora por proporcionar diminuição nos custos de produção, acarretando aumento na lucratividade, além de reduzir o índice de desperdício causado pelas indústrias de alimentos. Nesse sentido, as pesquisas com bioprocessos desempenham um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos visando produzir compostos com alto valor agregado de grande interesse industrial (Vilhalva *et al.*, 2011; Dantas *et al.*, 2010).



## 2- Bioaromas

De acordo com a resolução nº. 22 de 1976 da CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos), pertencente ao Ministério da Saúde, aromas são “mistura de substâncias, possuidoras de propriedades sápidas e odoríferas ou somente sápidas, capazes de conferir odor e/ou sabor aos alimentos e bebidas” (Spezialli, 2012).

São formados por substâncias voláteis de baixo peso molecular e que se apresentam em quantidades ínfimas que são responsáveis pela excitação dos receptores conhecidos como bastonetes olfativos, que possuem cílios semelhantes a fios de cabelo e que estão localizadas no alto da cavidade nasal. No momento em que os compostos voláteis entram em contato com a mucosa olfativa, eles serão dissolvidos reagindo com os cílios das células sensoriais provocando uma reação química, produzindo um impulso elétrico que chegará aos lobos frontal e temporal do cérebro, traduzindo a substância em cheiro (Bicas, 2009).

O aroma é um das principais características de alimentos, bebidas e cosméticos que são geralmente empregados para melhorar, padronizar a qualidade sensorial de tais produtos e sua percepção é um processo intenso de uma série de eventos e leva o consumidor à aceitação ou à rejeição de um produto. Aproximadamente 6400 compostos voláteis naturais e 10000 compostos sintéticos sejam conhecidos (Bicas *et al.*, 2009; Paroul, 2011; Costa, 2013).

Geralmente os aromas naturais não apresentam uma função química específica, eles são resultados de misturas de vários compostos químicos como hidrocarbonetos, alcoóis, cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres ou lactonas (ésteres cíclicos), éteres e outras moléculas complexas obtidas de metabolismo secundário de plantas e de microrganismos. Mínimas mudanças na estrutura química destes compostos dão origem a grandes alterações nas propriedades organolépticas, em termos de intensidade, qualidade e limiar de detecção. Como por exemplo, aldeídos e cetonas são moléculas que apresentam a mesma funcionalidade química básica, mas, frequentemente apresentam características organolépticas diferentes (Bicas *et al* 2009; Calasans, 2012; Costa, 2013).

Os compostos aromáticos promissores de aromas podem ser classificados de acordo com a sua origem com aroma natural ou sintético. A legislação para aromas naturais é definida de forma clara pelos órgãos competentes na Europa, EUA e Brasil.

A diretiva do conselho das Comunidades Europeias (88/388/CEE) define aroma como preparados aromatizantes, os aromas de transformação, os aromas de fumeiro ou as suas misturas. A substância aromatizante é uma “substância química definida que apresente propriedades aromatizantes e é obtida por processos físicos adequados (incluindo a destilação e a extração por solventes), ou por processos enzimáticos ou microbiológicos a partir de uma substância de origem vegetal ou animal não transformado ou transformado para o consumo humano por meio de processos tradicionais de preparação de gêneros alimentícios (incluindo a secagem, a torrefação e a fermentação)”. Além dos processos físicos e microbiológicos, pode ser obtidos também por “síntese química ou isolada por processos químicos e quimicamente idênticos ou não a substâncias presentes naturalmente em substâncias de origem vegetal ou animal”.

Nos EUA, o código federal Food and Drug Administration (FDA, 2014), define o termo sabor natural ou aroma natural como óleo essencial, oleorresina, essência, hidrolisado de proteínas, destilado ou qualquer produto obtido através de aquecimento ou enzimático, que contém os constituintes aromatizantes derivados de uma especiaria, suco de frutas ou frutas, vegetais ou suco de vegetais, fungos comestíveis, ervas, casca, raiz, folha ou planta semelhante material, carnes, frutos do mar, aves, ovos, produtos lácteos, ou produtos de fermentação dos mesmos, cuja função significativa no alimento é de aromatizantes nutricional.

No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007), os aromas podem ser classificados com base na sua origem, como por exemplo: Aromas naturais, que compreendem os óleos essenciais, extratos, bálsamos, aromas isolados; aromas sintéticos, que inclui os aromas idênticos ao natural e os aromas artificiais; misturas de aromatizantes/aromas; aromas de reação ou de transformação e aromas de fumaça.

Atualmente os aromas mais consumidos são “idênticos ao natural”, que é uma classificação dos aromas sintéticos, obtidos por processos químicos e que possuem as mesmas moléculas aromáticas dos naturais. Os aromas naturais às moléculas são

obtidos a partir de produtos de origem animal ou vegetal, por processos físicos, os demais são criados por reações químicas de síntese em laboratórios. Quando essa síntese dá origem a moléculas que não existem na natureza, os aromas são considerados artificiais (Aditivos e Ingredientes, 2011).

Os compostos aromáticos podem ser obtidos através de três métodos de extração, como a extração diretamente da natureza, transformações químicas e por via biotecnológica (biotransformações microbiológicas e enzimáticas), que é bastante atrativa por oferecer vários produtos e por ser um processo mais limpo (Calazans, 2012).

A obtenção de aromas extraído da natureza é realizada através de extração de vegetais, embora apresentem desvantagens como a obtenção do produto de interesse em baixas concentrações, a sazonalidade, problemas envolvendo a extração como possíveis fatores ecológicos e variações na qualidade do produto final (Bicas *et al* 2009; Galvão, 2014). Vários compostos de aromas frutais de pitanga foram extraídos por Malaman *et al.*, (2011) utilizando dióxido de carbono ou induzindo a produção de aromas pela própria cultura de células vegetais que possuem habilidade de transformar substratos exógenos, como subprodutos industriais, em produtos de interesse.

A obtenção de aromas por transformações químicas apresentam vantagens como rendimentos satisfatórios e bons índices de produção. No entanto, possui também muitos obstáculos, como custo de produção acentuados devido vários passos para a obtenção, além de gerar resíduos não biodegradáveis e de produzir misturas de produtos que alteram sensorialmente o aroma desejado reduzindo seu interesse econômico. Os compostos obtidos quimicamente são rotulados como "artificial" ou "natureza idêntica" (Bicas *et al* 2009).

A obtenção de aromas por processos biotecnológicos é largamente produzidos em vários segmentos industriais, uma vez que ocorre em condições suaves, não gera resíduos tóxicos e os produtos obtidos podem ser chamados de “natural” já que itens com este rótulo tem sido bastante procurado devido a conscientização dos consumidores em relação a alimentação e saúde (Calazans, 2012).

Os bioaromas são metabólitos obtidos por fermentação, onde os microrganismos, como fungos, bactérias e leveduras são cultivados em diferentes meios

para a produção de aromas. A produção de aromas utilizando microrganismos existe a centenas de anos, que inicialmente, este processo fermentativo tinha como objetivo o aumento de vida de prateleira devido a formação de ácidos e outros compostos contribuindo significativamente numa maior conservação do produto (Melo Jr, 2010).

Avanços recentes na biotecnologia, no monitoramento de bioprocessos e nas técnicas de recuperação de produtos proporcionaram novas oportunidades em potencial para a biotecnologia de produção de aromas. No entanto, apesar desses avanços nos processos biotecnológicos, poucos compostos aromáticos são produzidos em escala industrial devido suas baixas concentrações nos fermentados e isso resultam num alto custo de processo. Porém, isto é compensado pelo fato que o preço dos aromas naturais é de 10 a 100 vezes maior do que os sintéticos (Bier, 2011).

Para a síntese desses compostos aromáticos, são utilizados processos biotecnológicos que são divididos em métodos microbiológicos e enzimáticos. Os métodos microbiológicos são subdivididos em biossíntese e biotransformação; o primeiro também é conhecido como síntese *de novo*, e significa produção de aromas pela fermentação de nutrientes simples, como açúcares e aminoácidos, enquanto que a biotransformação refere-se às reações do tipo oxidação, redução, reações hidrolíticas, formação de novas ligações C-C e reações de degradação catalisadas enzimaticamente para resultar em um produto estruturalmente semelhante à molécula de substrato (Medeiros et al ., 2003; Bicas *et al* 2009).

A produção de aromas por biossíntese atua intensamente nas indústrias de alimentos, rações , cosméticos , produtos químicos e farmacêuticos. É uma alternativa bastante viável baseada em processos microbianos através da fermentação para a produção de importantes compostos voláteis como os terpenos do tipo citrionelol, geraniol, linalol, nerol,  $\alpha$ -terpineol utilizando cepas de *Ceratocystis* e *K. Lactis* para produção de aromas frutais/florais (Bluemke *et al.*, 2001; Lanza *et al.*, 1976; Hubball *et al.*, 1978; Damasceno *et al*, 2003), lactonas do tipo 6- pentil- $\alpha$ -pirona utilizando *T.harzianum* para produção de aroma de coco (Hausler e Munch 1997; Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2009), entre outros.

A biotransformação ou bioconversão pode ser definida como o uso de sistema químico catalisado por microrganismos ou enzimas para produzir mudanças químicas em compostos que não são seus substratos originais. São geralmente realizadas com

culturas de crescimento, células previamente cultivadas, células imobilizadas, enzimas purificadas ou sistemas de multifase (Bicas, 2009; Bier, 2011).

O fator crucial para a execução da biotransformação é identificar cepas de microrganismos resistentes que possam utilizar substratos como fonte de carbono para a produção de metabólitos desejáveis e em quantidades satisfatórias. Além disso, condições de cultivo como a composição do meio de cultura, pH, temperatura de incubação, aeração e agitação são fatores importantes que vão influenciar no tipo e na quantidade de aroma produzido (Luz, 2010).

Pesquisadores afirmam que o limoneno é um dos precursores mais estudados em experiências de biotransformação cujos diferentes microrganismos degradam esta molécula para a produção de  $\alpha$ -terpineol. Este composto é um álcool monoterpene amplamente aplicado em cosméticos, alimentos e utensílios domésticos produtos e preparações de sabor (Bauer *et al.*, 2001). A vanilina também é um composto aromáticos utilizado nas indústrias de alimentos e farmacêuticas que é produzida através de biotransformações microbianas com elevados rendimentos. Sua maior obtenção foi através a bioconversão de ácido ferúlico em vanilina por linhagens de *Amycolatopsis* sp com uma produção final de , respectivamente , 11,5 g/l ( taxa de conversão de 77,8 % ), após 32 h ( Rabenhorst ; Hopp , 2000) e 13,9 g/l ( rendimento de 75 % ) após 17 horas de alimentação do substrato ( Muheim *et al.* , 2001).

Por fim, os processos enzimáticos utilizados na obtenção de aromas oferecem alta seletividade para a conversão de um determinado substrato. Geralmente esses compostos aromáticos são obtidos através de catálises de algumas enzimas como lipases, proteases, glicosidases, pectinases, esterases, etc, ou através de métodos eficientes como a imobilização de enzimas (Pandey *et al.*, 2008). Diversas classes de enzimas podem ser utilizadas na biotransformação de matérias-primas, gerando aromas de interesse industrial.

A classe de enzimas mais utilizada para produção de aromas é a da lipase de fungos dos gêneros *Mucor*, *Aspergillus* e *Rhizopus* e de leveduras do gênero *Candida* que são produzidas industrialmente e têm sido testadas quanto à seletividade e eficiência na produção de ésteres de cadeia curta (Langrand *et al.*, 1990; Manjón *et al.*, 1991; Razafindralambo *et al.*, 1992).

### 3- Compostos voláteis de aroma

A formação dos aromas naturais se dá com o resultado de misturas de compostos químicos voláteis que apresentam estruturas complexas de vários grupos funcionais. Essas misturas se tornam essenciais para o desenvolvimento de características sensoriais que definem a apreciação dos consumidores. Quantitativamente, a formação desses compostos químicos chega a centenas de tipos, porém é produzido em baixas concentrações tornando árduo o desenvolvimento de métodos biológicos para a obtenção de aromas específicos (Fusco, 2015; Galvão, 2014; Food Ingredients Brasil, 2014).

A intensidade e a qualidade de um aroma não são necessariamente determinadas pelos componentes presentes nas maiores concentrações. A percepção da substância aromática é denominada “threshold”, que é definido quando a concentração mínima de um composto for detectada pelo sentido do olfato. Este valor mínimo de percepção absoluta nos alimentos depende de diversos fatores como a pressão de vapor dos compostos voláteis, que à medida que se reduz observa-se uma perda no poder aromatizante, da temperatura do alimento, de sua composição e das interações dos aromas com lipídios, proteínas e carboidratos, os quais afetam diretamente a dispersão destes na fase gasosa (Medeiros *et al.*, 2003).

O metabolismo de fungos filamentosos, leveduras, plantas e animais resultam na mistura de moléculas complexas responsável pela aromaticidade de um produto. Diferentes reações como as oxidações, hidrólises, nitrificações, isomerizações, esterificações são realizadas por esses microrganismos utilizando vários substratos para a obtenção de diversas classes de compostos aromáticos (Calazans, 2012).

Dentre as funções químicas dos principais componentes aromáticos utilizados na elaboração de aromas destacam-se entre as mais importantes os alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, terpenos, lactonas, entre outros resultantes do metabolismo secundário de plantas ou de fontes animais como também pode ser obtidos por vários microrganismos (Valduga *et al.*, 2010).

Os alcoóis desempenham papel modesto, pois são os menores constituintes para a formação do aroma, a não ser que estejam em altas concentrações e são importantes precursores de compostos, como por exemplo, aldeídos e ésteres. O processo de formação do álcool surge a partir da via metabólica primária de um microrganismo ou

pela redução de uma carbonila em seu álcool correspondente (Medeiros *et al.*, 2003; Brigido, 2000).

Culturas de leveduras produzem os principais alcoóis como, etanol, propanol, butanol, isobutanol, amil e isoamil álcool e fenil etil álcool, propanol, 2-metilbutanol, hexanol e 2-feniletanol. No cultivo de fungos como *Hansenula anomala*, *Kluveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* tem mostrado potencial para produção do 2-feniletanol, derivado de 2-fenilalanina por bioconversão, composto que dá origem a fragrância de pétalas de rosas, bastante utilizado em indústrias de alimentos, cosméticos e perfumes (Longo e Sanromán, 2006).

Aldeídos são compostos bastante voláteis e de aromas forte que é influenciado pelo tamanho da cadeia e quantidade presente. São exemplos de aldeído, a vanilina (odor de baunilha) que é bastante apreciada e de reservas limitadas por isso estimula-se pesquisas para produção biotecnológica. O formaldeído, furfural e acetaldeído, que apresentam aromas indesejáveis, mas este apresenta grande importância comercial contribuindo para o frescor e pungência de alimentos e bebidas. O hexanal e o benzaldeído também são outros tipos de aldeído importante nas indústrias de cosméticos para produção de fragrâncias e na indústria de alimentos. (Alcarde *et al.*, 2011; Longo e Sanromán, 2006; Dudareva *et al.*, 2004).

As cetonas são identificadas pela presença do grupo carbonila e são classificadas em alifáticas, aromáticas ou derivadas de fenol. Diacetil é um exemplo de cetonas alifáticas responsáveis por parte do aroma em uma vasta gama de produtos lácticos, principalmente queijos (cheddar, cottage) e também os principais componentes do aroma da manteiga. É produzido por via sintética a partir da butanona e por via fermentativa através de diversos microrganismos (bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bacillus*) usando como substrato glicose e outras fontes de carbono (Carvalho, 1999).

Os ésteres são substâncias orgânicas facilmente encontradas na natureza, tipicamente em frutas, com concentrações entre 1 e 100 ppm e desempenham um papel importante na indústria farmacêutica, de perfumes, de polímeros, de cosméticos e estão presentes na composição de produtos alimentícios para realçar e imitar sabores e aromas. O baixo peso molecular desses compostos os torna de grande importância na

classe de aromas, pois muitos deles são responsáveis por odores de frutas (Medeiros *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2013).

Os ésteres foram inicialmente produzidos sinteticamente, mas podem ser formado também a partir das rotas enzimáticas e microbiológicas, sendo que esta é formada através da alcoólise de compostos de Acyl-CoA. Muitos deles são constituídos por ácidos e seus derivados de cadeia curta como os propionatos, butiratos e os acetatos, destacando-se o acetato de isoamila, acetato de feniletila e acetato de etila (AcOEt), líquido límpido, incolor, volátil e com odor agradável que apresenta alto poder de solvência, produzido principalmente pela reação do ácido acético com etanol (Janssens *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 2013).

Os terpenos são metabólitos secundários de plantas, produzidos, em parte, para defesa contra microrganismos e insetos. Devido a suas propriedades organolépticas diferenciadas, certos monoterpenos são utilizados em fragrâncias e como ingredientes em alimentos. As propriedades aromatizantes dos terpenos podem ser sintetizadas como metabólitos secundários por uma grande variedade de vegetais superiores e microrganismos, que possuem capacidade de biossíntese, biotransformação e bioconversão de precursores de terpenos. Terpenos, tais como: linalol, geraniol, nerol, citronelol, geranial e neral foram identificados em cultivos de *Ceratocystis variispora*, *C. moniliformis* e *Trametes odorata*. (Bicas *et al.*, 2009; Calasans, 2012).

As lactonas são ésteres cíclicos associados aos odores de frutas, doces, coco, nozes, produtos lácteos, entre outros que possuem propriedades sensoriais marcantes e por terem a síntese microbiológica relativamente bem conhecida. Microrganismos, como *Ceratocystis moniliformis*, *Trichoderma viride*, *Sporobolomyces odoratus* são produtores de lactonas, mas que apresentam rendimentos baixos. Já fungos como *Tyromyces sambuceus* e *Cladosporium suaveolens* produzem lactonas do tipo decalactona de forma promissora (Janssens *et al.*, 1992; Longo e Sanromán, 2006).

Outro microrganismo importante produtor de lactona são fungos do gênero *Trichoderma* que são capazes de produzir 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6-PP), molécula com forte odor de coco e está presente entre os componentes dos aromas de pêssegos e nectarinas e que apresenta potente atividade antifúngica e de baixa toxicidade a mamíferos. (Medeiros, 2003; Rossi, 2011).



As pirazinas são compostos aromáticos heterocíclicos que contem dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4 de um anel de seis membros. É um composto volátil característicos de alimentos submetidos a tratamento térmico, geralmente formado através de reação de Maillard. São bastante usadas como aditivos para contribuir no aroma de alimentos pré-prontos, pois é um produto bastante consumido atualmente (Longo e Sanromán, 2006). *Bacillus subtilis* foi uma bactéria pioneira a produzir pirazina (tetrametil). Existem outros exemplos de pirazinas que são utilizadas como aroma de ervilha (3-metoxi-isopropil-pirazina), aroma de pimenta (2-metoxi-3-isobutil-pirazina), aroma de nozes (2,5-dimetil-pirazina) (Reineccius, 2006).

#### 4- Acetato de Etila (AcOEt)

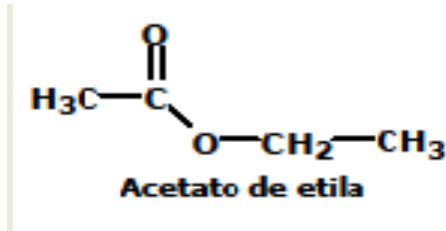
O acetato de etila é o éster bastante utilizado na indústria alimentícia como aromatizante de bebidas, além de ser um composto orgânico natural presente em muitas frutas e bebidas alcoólicas como cachaças, vinhos e cervejas. É um dos compostos voláteis secundários da fermentação alcoólica dos vinhos interferindo na qualidade do aroma e proporciona um sabor indesejável à cachaça quando estão presentes em grandes quantidades (Chazin, 2012).

Quimicamente é um solvente orgânico oxigenado utilizado em laboratórios de síntese orgânica como reagente e na extração e purificação de produtos orgânicos. Outras aplicações deste composto são na fabricação de fitas de áudio e de vídeo, como agente de limpeza de aparelhos de som e vídeo, em explosivos, têxteis, couro artificial, filmes fotográficos e também como removedor de esmalte de unha e corantes. Na indústria farmacêutica, é utilizado como solvente de extração e para a concentração e purificação de antibióticos como sulfametoxazol e rifampicina (Pattanaik *et al.*, 2011; Chazin, 2012).

A produção industrial do acetato de etila tem bastante destaque na China que é considerada a maior consumidora e produtora de AcOEt. No período de 1995 a 2005, o consumo cresceu, em média, 18,7% ao ano e a demanda projetada continuou alta no período de 2006 a 2010, com crescimento estimado de 7% ao ano. No Brasil, os principais produtores de AcOEt são, a Cloroetil, em Mogi Mirim/SP, e a Butilamil, em Piracicaba/SP e Rhodia, em Paulínia/SP que é uma das maiores produtoras mundiais, ao lado da Ineos no Reino Unido, a Celanese no México, a Showa Denko no Japão, e as fábricas chinesas Shangahi Huayi, Jiangsu Sopo e Goldym Jinyimeng (Melo Jr, 2010).

Suas características físico-químicas o classificam como um éster líquido à temperatura ambiente, incolor, volátil, com odor característico de frutas, de polaridade moderada e não higroscópico, sendo instável na presença de bases forte e ácido aquoso (Pattanaik *et al.*, 2011). Na tabela 1 estão representadas as principais características físico-químicas do AcOEt.

**Tabela 1:** Propriedades físicas e químicas do acetato de etila (AcOEt).

| Propriedades       | Descrição  |
|--------------------|--|
| Características    | Líquido límpido e com odor agradável de fruta  |
| Coloração          | Incolor  |
| Densidade          | 0.897 g/cm <sup>3</sup> , líquido  |
| Fórmula Centesimal | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   |
| Fórmula estrutural |  <p>Acetato de etila</p> |
| Massa molecular    | 88,11 g/mol  |
| Ponto de ebulição  | 76,5 - 77,5 °C   |
| Ponto de fusão     | -84 °C   |
| Sinônimos          | Etanoato de etila, éter acético, éster etílico acético e éster etílico do ácido acético.                   |
| Solubilidade       | Solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos como etanol, acetona, éter e clorofórmio.             |

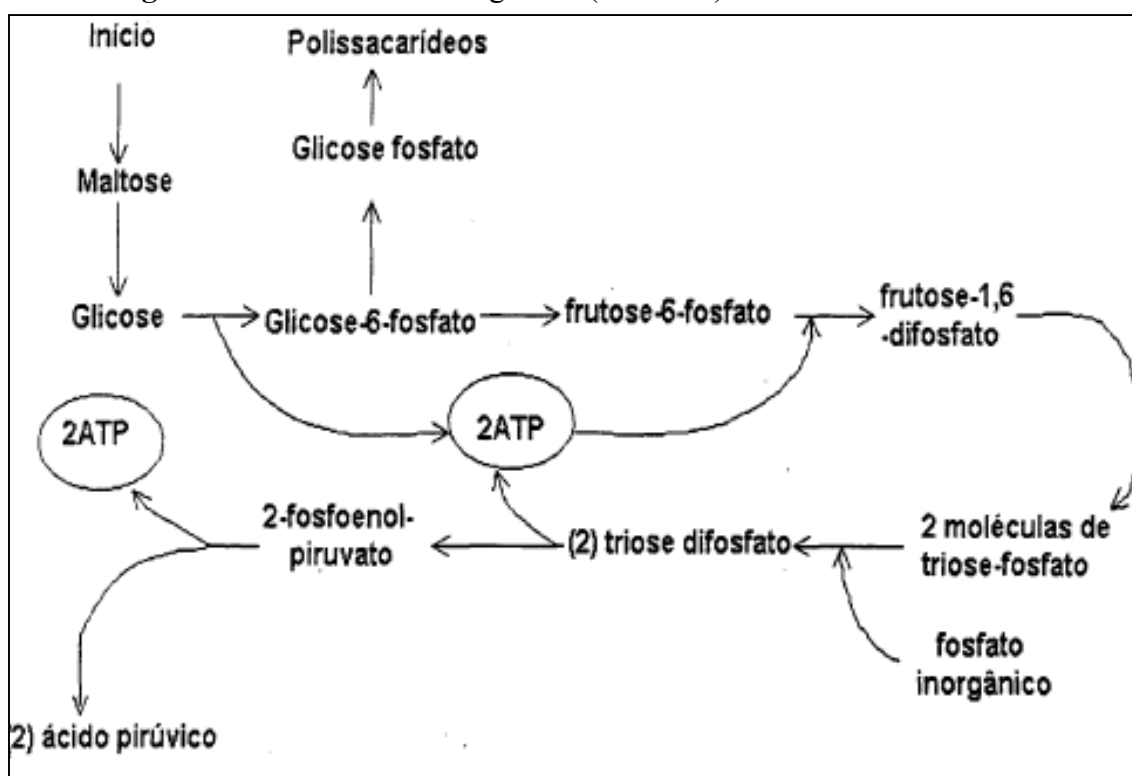
Fonte: Sigma (2014) <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solvents/ethyl-acetate-center.html>

Atualmente, a produção industrial do acetato de etila ocorre através dos processos de Esterificação do Ácido Acético com Etanol, Reação de Tishchenko, Adição Direta de Ácido Acético ao Etileno e Desidrogenação de Etanol. Mas, nesta tese será abordada a produção de acetato de etila através de microrganismo.

A biossíntese desta classe de compostos dá-se pela esterificação enzimática de ácidos carboxílicos com alcoóis, através da ação de algumas enzimas como esterases, álcool acetil transferases e acetil-CoA.

A produção de acetil-CoA, passo fundamental para a produção de ésteres de acetato, pode ser compreendida pela análise da via metabólica da glicólise, como pode ser visto na Figura 2. A glicose utilizada nas fermentações entra na via glicolítica, seguindo-a até a chegada ao piruvato, componente importante para a produção do acetil-CoA, peça fundamental para a produção do acetato de etila.

**Figura 2:** Via metabólica da glicose (Glicólise)

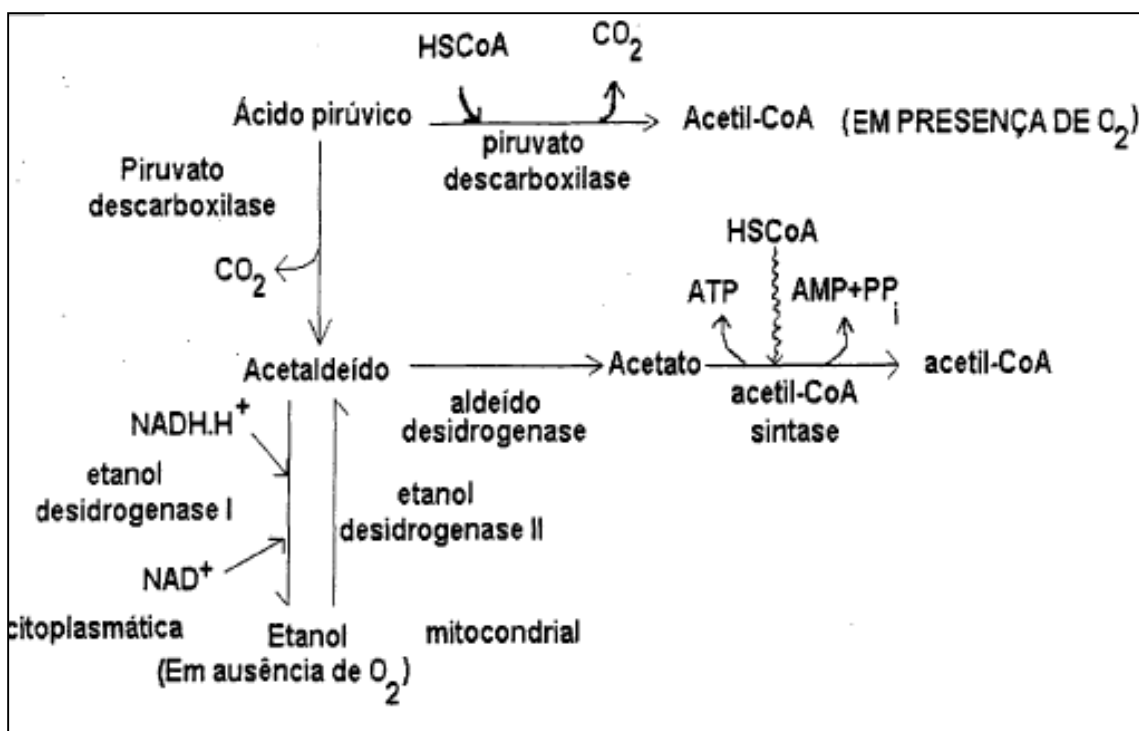


Fonte: VOET (1990)

A partir do piruvato encontram-se duas vias para a formação de acetil-CoA, conforme mostra a figura 3:

- 1- em aerobiose, por ação da enzima piruvato descarboxilase;
- 2- em anaerobiose, onde ele pode se transformar em acetaldeído, pela enzima piruvato descarboxilase, ou ainda, pode-se formar acetato através da enzima aldeído desidrogenase, ou pode também ir a etanol, bastando que a enzima etanol desidrogenase catalise a transformação de acetaldeído em etanol.

**Figura 3:** Vias metabólicas propostas para a produção de acetil-CoA.



Fonte: VOET (1990)

O processo fermentativo para obtenção de voláteis apresenta-se algumas dificuldades, como sua baixa concentração apresentando problemas durante o processo de extração e recuperação proporcionando altos custos na sua produção. A concentração do produto final presente no meio de cultivo também é outra dificuldade nesses processos fermentativos, pois é necessário mantê-la abaixo de determinados níveis, devido a efeitos toxicológicos ou inibitórios nos microrganismos (Janssens *et al.*; 1992).

A literatura relata alguns trabalhos relacionados a produção de acetato de etila através de processos fermentativos.

Janssens *et al.* (1987) identificaram e quantificaram o aroma frutal de banana produzido pela levedura *Hansenula mrakii* e pelo fungo *Geotrichum penicilliatum* em fermentação líquida de um meio sintético. No estudo desenvolvido com a levedura, concluiu-se que o aroma frutal ocorria devido à biosíntese de ésteres e álcoois. Num total de 17 compostos identificados, aqueles detectados em concentrações superiores a 50 µL/L foram: etanol, etil acetato, isobutanol, etil propionato, isobutil acetato e isopentil acetato. No cultivo do fungo filamentoso foram identificados 33 compostos, sendo encontrados em quantidades superiores a 50 µL/L: etanol, etil acetato, isobutanol, etil propionato, propil acetato, isopentanol, etil isobutirato, isobutil acetato, etil butirato,

etil isovalerato, isopentil acetato e etil hexanoato. O componente produzido em maior concentração foi etil acetato (9924,1 µL/L).

PASTORE *et al.* (1994) estudaram oito linhagens de *Neurospora* sp isoladas do beiju na produção de compostos voláteis e atingiu-se as seguintes concentrações: etil acetato 0,9 ppm, etanol 111 ppm, isoamil acetato 117 ppm, etil hexanoato 16 ppm e 1-octen-3-ol 50 ppm, este último responsável aroma típico de cogumelos.

Bramorski *et al* (1998) estudaram a capacidade do fungo *Ceratocystis fimbriata* de produzir aromas frutais a partir da fermentação sólida e foram detectados 15 compostos: 6 álcoois (etanol, 2-propanol, 1-propanol, 1-butanol, álcool isoamílico), 5 ésteres (acetato de etila, propionato de etila, butanoato de etila, acetato de butila, acetato de isoamila), 2 cetonas (acetona, 2-hexanona), 1 ácido (ácido acético) e 1 aldeído (acetaldeído).

Damasceno (1999) estudou a fermentação de *Geotrichum fragrans*, isolada de manipueira na produção de compostos voláteis. Foram identificados o acetato de etila, 3-metil 1 butanol, 2-metil 1-butanol, 1,3-butanediol, propionato de etila, 2-metil propionato de etila.

Soares *et al.* (2000) relataram a produção de aroma frutal por *Ceratocystis fimbriata* utilizando casca de café e glicose. A produção de acetato de etila e acetato de isoamila foram altamente estimulados pela adição de leucina ao meio, produzindo cheiro forte de banana.

Medeiros *et al.* (2000) utilizaram a levedura *Kluyveromyces marxianus* cultivada em distintos meios sólidos agroindustriais como bagaço de mandioca e farelo de palma forrageira produziu compostos com características frutais, sendo o acetato de etila o éster produzido em maior concentração.

Medeiros *et al.* (2003) utilizaram duas cepas de *Ceratocystis fimbriata* para produção de aromas através da fermentação em estado sólido utilizando resíduos de café onde foram produzidos 12 compostos voláteis e os majoritários foram: acetato de etila, etanol e acetaldeído, responsáveis pelo aroma frutal.

Medeiros *et al.* (2006) avaliaram a produção de compostos voláteis utilizando *Ceratocystis fimbriata* em casca de café como substratos em dois diferentes tipos de bioreator: coluna (escala laboratorial) e horizontal (semi-piloto). Foram detectados 20 compostos voláteis através de headspace, dentre eles: acetato de etila, etanol, acetaldeído, propionato de etila e acetato de isoamila.

Damasceno et al. (2003) estudaram a produção de compostos voláteis por *Geotrichum fragans* usando manipueira como substrato. Os compostos voláteis produzidos após 72 hs de fermentação foram: acetato de etila, 1- butanol, 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 2-metil-1-butanol, propionato, 2-metil-etil-propionato.

Rossi et al. (2009) utilizaram o fungo *Ceratocystis fimbriata* através da fermentação em estado sólido da polpa cítrica suplementada com 50% de farelo de soja, 25% de melaço de cana de açúcar e solução salina e obtiveram 99,6 µmol/L de compostos voláteis: acetato de etila, acetaldeído, etanol, acetato de isoamila, acetato de propila, isobutirato de etila 2-hexanona, 2-hexanol.

Loser et al. (2013) utilizaram *Kluyveromyces marxianus* no Soro de leite com o objetivo de converter a lactose do soro de leite em acetato de etila. O soro de leite continha 40 g / l de Fe e o pré-inóculo foi suplementado com 1, 3 ou 10 mg / L de Fe. O teor de Fe no pré-inóculo promoveu o crescimento da cultura no fermentado provocando um alto consumo de açúcar e formação insatisfatória de acetato de etila.

## 5- Mercado de aromas

O setor de aromas e fragrâncias em suas diversas aplicações representa não somente um mercado global multibilionário, mas também uma fonte de desenvolvimento científico e de inovação constante. Atualmente o mercado de aroma é dominado por aromas artificiais, aproximadamente 80% dos aromas e fragrâncias são produzidos sinteticamente, mas tem percebido uma tendência ao uso de aromas naturais devido à conscientização do consumidor com relação ao uso de produtos saudáveis. A demanda entre as indústrias alimentícias por aromas naturais teve um acréscimo de 10% para 80% ( Damasceno *et al.*, 2001; Speziali, 2012).

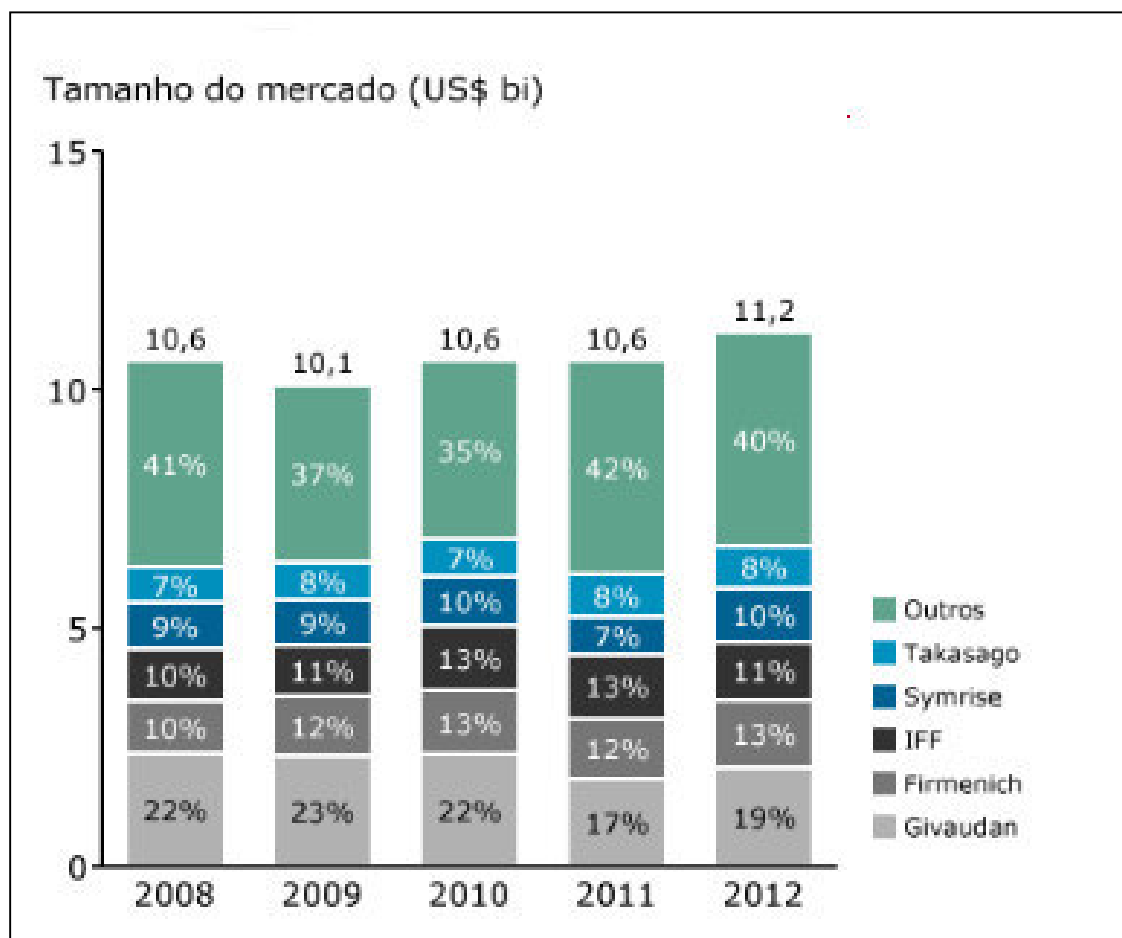
Uma análise mercadológica para bioaromas afirma que a produção de aromas por microrganismos com valor de mercado a partir de 200\$/kg torna-se bastante econômica, no entanto aromas produzidos com preços inferiores a este valor torna a produção por biossíntese inviável. Isso significa que o valor econômico no mercado do composto aromático produzido e a elasticidade do seu preço poderá se tornar vantajosa ou não a biossíntese de um aroma (FIB, 2015).

Nos anos de 1987 e 1989, os aromas movimentaram cerca de sete bilhões de dólares por ano no comércio mundial, representando 25% do total de aditivos comercializados no mercado. Atualmente, a demanda mundial de aromas representa cerca de 1/4 do mercado mundial de aditivos alimentícios, movimentando em torno de 22 bilhões de dólares por ano. O mercado brasileiro de aromas, que registrou um faturamento de 1,2 bilhão de dólares em 2012, representa cerca de 6,5% do mercado global. Estima-se um crescimento anual médio de 6,7% entre 2012 e 2017, superior ao crescimento do mercado mundial, de 5,2% ao ano, previsto para o mesmo período (Dubal *et al.*, 2008.; Bain e Gás Company, 2014).

No mercado mundial os cinco maiores líderes da indústria dominam 60% do mercado de aroma e, em 53% em fragrâncias. Esses líderes são: Givaudan (Suíça), Firmenich (Suíça), IFF (EUA), Symrise (Alemanha) e Takasago (Japão). No Brasil, o grande competidor é a empresa Duas Rodas, líder nacional de aromas e sabores, com sede em Jaraguá do Sul (SC). Seu faturamento, em 2013, atingiu 550 milhões de reais, sendo parcela deste atribuída a atividades de exportação para 29 países. A empresa possui sete unidades de produção no Brasil e em outros países da América Latina (Bain e Company Gás Company, 2014).



O padrão de consumo e o crescimento do segmento em questão são estimulados pelas indústrias consumidoras. A indústria de alimentos e bebidas são as maiores consumidoras de aromas e sabores, pois o mercado nacional de alimentos processados representou 112 bilhões de dólares, e deve crescer até 179 bilhões de dólares em 2018, apontando um crescimento esperado de 8,2% ao ano. O mercado de bebidas, por sua vez, é de 49 bilhões de dólares (2012) e deve crescer 5,4% ao ano até 2017, atingindo 5,4% (Euromonitor International, 2013).



**Figura 4:** Participação do mercado global de Aromas e Sabores. (Fonte: Lucintel, 2013; Análise Bain e Company Gas Energy, 2014).

O setor individual da indústria de *flavor* e fragrâncias compreendem os compostos utilizados para caracterizar o odor ou o gosto de um produto. Nesse segmento, incluem-se os seguintes subsegmentos: Óleos Essenciais e Extratos Naturais, Aromas Químicos, Compostos de Aromas e Sabores, Compostos de Fragrância (Lucintel, 2013).

No âmbito industrial, a maioria dos compostos aromáticos é obtida por processos químicos ou através de extrações de recursos naturais, como plantas, flores, ação de enzimas e microrganismos. Nesse contexto, a biotecnologia se mostra como uma das maiores tendências da indústria em produzir ingredientes naturais que são utilizados em forma sintética (Dhillon *et al.*, 2013).

Um exemplo de como a biotecnologia representa uma rota alternativa de alto potencial para a substituição de matérias-primas sintéticas pode-se citar o caso da vanilina, que é um extrato da semente de baunilha, atualmente importada no Brasil, mas que poderia ser produzida a partir de uma rota natural no país, como, por exemplo, a partir do ácido ferúlico que é extraído da parede celular de produtos agrícolas como o arroz e a cana de açúcar e que substitui a vanilina devido a propriedades em comum. Diante dessa tendência dos consumidores buscarem produtos ambientalmente sustentáveis que tragam menos riscos à saúde, torna o preço de venda dos ingredientes naturais consideráveis comparados aos seus similares sintéticos, podendo chegar a um valor quatro ou cinco vezes superior (Bain e Company Gas Energy, 2014).

## 6- Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica bastante antiga sendo muito difícil de afirmar o tempo exato do início dessa prática pela atividade humana, pois muitos alimentos foram produzidos através desse processo microbiano e faziam parte da dieta de diversos povos antigos. Como por exemplo, a produção do molho de soja na China em 1000 a.C e a de “chiang” entre 2500 e 500 a.C (Araújo, 2004).

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido pode ser definida como a deposição de microrganismos sobre partículas sólidas umedecidas ou suportes inertes suficiente para o crescimento celular entre os fragmentos do substrato ou sobre a superfície do substrato, consumindo-o e secretando metabólitos, conforme mostra a Figura 5 (Mitchell *et al.*, 2006a; Ferreira *et al.*, 2011).



**Figura 5:** Fermentação em estado sólido da farinha da casca de mandioca.

Fonte: (Autora, 2015).

É considerada uma ferramenta bastante útil devido a valorização de produtos lignocelulósicos e fibras alimentares e produção de diversos compostos de alto valor

industrial , tais como enzimas, alimentos fermentados, ácidos orgânicos, aromas, entre outros (Soares *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2006).

Devido a grande utilização deste processo em diversos setores (Tabela 2), a necessidade de desenvolvimento de novos processos em FES e otimização dos processos existentes torna-se de interesse econômico, levando-se ainda em consideração as vantagens que este tipo de fermentação oferece em diversos segmentos.

**Tabela 2:** Aplicação da FES em diferentes setores industriais

| SETOR                    | APLICAÇÃO                  | EXEMPLOS  |
|--------------------------|----------------------------|---|
| Indústria agro-alimentar | Fermentações de alimentos  | Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, Queijos fermentados          |
|                          | Produção de cogumelos      | <i>Agaricus</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Shiitaki</i>      |
|                          | Bioconversão de resíduos   | Compostagem, Detoxificação, Silagem                       |
|                          | Aditivos alimentares       | Aromas, Gorduras essenciais, Ácidos orgânicos             |
| Agricultura              | Biocontrole, Biopesticidas | Beauveria, Metarrhizium, Trichoderma                      |
|                          | Crescimento de plantas     | <i>Giberelinas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Tricoderma</i> |
|                          | Micorrização               | Inóculo de plantas  |
| Fermentações industrial  | Enzimas                    | Amilases, Celulases, Pectinases, Proteases, Xilanases     |
|                          | Antibióticos               | Penicilina, Probióticos                                   |
|                          | Ácidos orgânicos           | Ácido cítrico, fumárico, gálico, láctico                  |
|                          | Etanol                     | Schawanniomyces sp.                                       |
|                          | Metabólitos fúngicos       | Hormônios, alcalóides                                     |

Fonte: RAIMBAULT, 1998

Uma das principais características da FES é a utilização de substratos simples como os produtos agrícolas fibrosos para facilitar a absorção de água que é essencial para o sucesso deste processo e que forneçam os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo como carboidratos (celulose, amido, açúcares), fontes de nitrogênio (amônia, uréia, peptídeos) e sais minerais (Oliveira *et al.*, 2012).

O preparo do resíduo é essencial para torná-lo passível de uso sob as condições necessárias para o crescimento do microrganismo, como a hidrólise química ou enzimática das grandes cadeias de açúcares para torná-lo acessíveis aos microrganismos, ou um cozimento com água ou tratamento a vapor para umidificar ou para degradação da estrutura macromolecular e eliminação de contaminantes ou inibidores de crescimento do microrganismo, suplementação com nutrientes, correção de pH e umidade, ou a moagem de grandes blocos de substrato para partículas menores (Strapasson, 2003; Santos *et al.*, 2006; ).

A natureza da fase sólida tem uma influencia durante fermentação em estado sólido. O substrato e suporte podem funcionar como meio de cultura, ou seja, quando, o microrganismo utiliza o próprio suporte como fonte de carbono. Ou o substrato não contém nutriente, ou seja, fase sólida inerte, e o meio de cultura são adsorvidos sobre um substrato (Strapasson, 2003).

Outra característica importante da FES é a presença dos fungos filamentosos que são os principais microrganismos cultivados em meio sólido devido a sua facilidade de desenvolver-se em umidades muito baixas, da ordem de 12%, porém os níveis de umidade relativa variam de 12 a aproximadamente 80%. Além disso, sua forma de desenvolvimento vegetativo é constituída por hifas aéreas ramificadas, propícias à colonização de matrizes sólidas porosas que se assemelham as condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza, sendo considerada mais natural que a fermentação submersa (Santana, 2012). A tabela 3 mostra diversos microrganismos utilizados na fermentação sólida.

**Tabela 3:** Principais microrganismos utilizados na fermentação em estado sólido

| <b>Microrganismos</b>              | <b>Fermentação em Estado Sólido</b>                  |
|------------------------------------|--|
| <b>Fungos Filamentosos</b>         |  |
| <i>Altemaria sp</i>                | Compostagem  |
| <i>Aspergillus sp.</i>             | Compostagem, Alimentos                               |
| <i>Fusarium sp.</i>                | Compostagem, Giberelinas                             |
| <i>Monilia sp.</i>                 | Compostagem  |
| <i>Mucor sp.</i>                   | Compostagem, Alimentos, Enzimas                      |
| <i>Rhizopus sp.</i>                | Compostagem, Alimentos, Enzimas,<br>Ácidos orgânicos |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Compostagem, Degradação de lignina                   |
| <i>Trichoderma sp.</i>             | Compostagem, Controle biológico,<br>bioinseticida    |
| <i>Aspergillus oryzae</i>          | Koji, Alimentos, Ácido cítrico                       |
| <i>Rhizopus oligosporus</i>        | Tempeh, Soja, Amilase, Lipase                        |
| <i>Aspergillus niger</i>           | Alimentos, Proteínas, Amilase, Ácido<br>cítrico      |
| <i>Penicilium roqueforti</i>       | Penicilina, queijo                                   |
| <b>Leveduras</b>                   |  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    | Alimentos, Etanol                                    |
| <i>Schawanniomyces castelli</i>    | Etanol, Amilase                                      |
| <b>Bactérias</b>                   |  |
| <i>Bacillus sp</i>                 | Compostagem, Amilase                                 |
| <i>Pseudomonas sp.</i>             | Compostagem  |
| <i>Serratia sp.</i>                | Compostagem  |
| <i>Streptococcus sp.</i>           | Compostagem  |
| <i>Lactobacillus sp.</i>           | Silagem, Alimentos                                   |
| <i>Clostridium sp.</i>             | Silagem, Alimentos                                   |

Fonte: RAIMBAULT, 1998

Em sistemas que utilizam a FES, além da escolha do microrganismo e seleção do substrato, para obter uma maximização do rendimento e formação do produto é importante o controle de parâmetros que são teor de umidade, pH, taxa de inóculo, temperatura, tamanho das partículas e aeração.

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água apresenta papel de destaque na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (Gervais & Molin, 2003). Ela está relacionada a dois parâmetros: o primeiro, a umidade, que está relacionada a porcentagem de água na massa total do meio; o segundo, a atividade de água ( $a_w$ ), quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato, ela afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (Pinto *et al.*, 2005).

A umidade relativa utilizada durante a fermentação em estado sólido depende do nível máximo de retenção de água de um material utilizado como substrato ou suporte, e pode variar entre 18 e 85%, mas é importante ressaltar que uma umidade acima da capacidade de absorção do resíduo torna o meio com baixa porosidade e baixa difusão do oxigênio, aumentando o risco de contaminação bacteriana. A atividade de água ( $a_w$ ), definida para uma zona adequada de crescimento de microrganismos ( $0,6 \leq a_w \leq 0,99$ ) (Pérez-Guerra *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2003).

O pH durante a fermentação em estado sólido é um dos parâmetros mais crítico de controlar devido a heterogeneidade e consistência do material, para amenizar este efeito utiliza-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de solução tampão durante a etapa de umidificação do substrato (Lonsane *et al.*, 1985).

A aeração é um fator importante para o desenvolvimento dos microrganismos, que depende da velocidade do fluxo de oxigênio pelo substrato e da rapidez de consumo de O<sub>2</sub> pelos microrganismos. Algumas linhagens podem se desenvolver melhor em taxas de aeração mais elevadas, mas a produção de alguns metabólitos pode ser reduzida, e vice-versa, por isso se faz necessário testar experimentalmente o material utilizado para a fermentação sólida, como tipo de frasco e tampão adequado para não influenciar na obtenção do produto desejado (Maciel, 2006).

Utiliza-se também a agitação para auxiliar na homogeneização da temperatura e do ambiente gasoso no interior do meio sólido, mas pode causar também a compactação do meio e danos das hifas (Lonsane *et al.*, 1985).

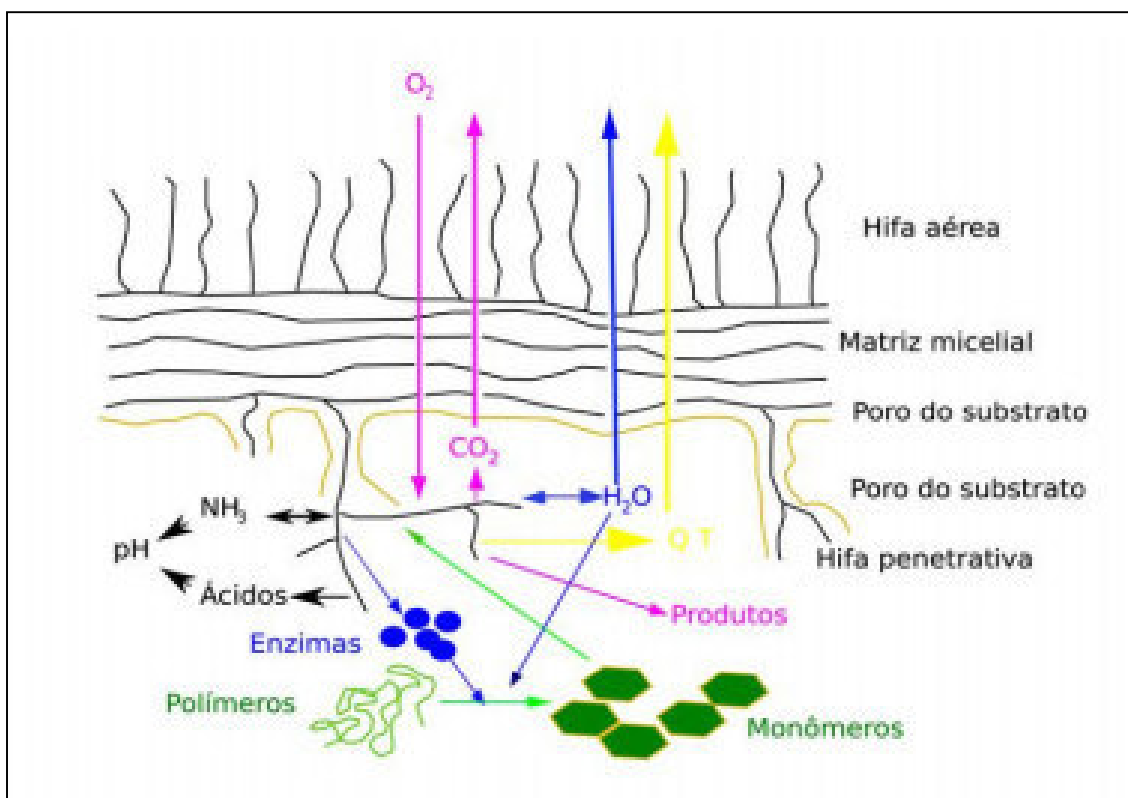
A temperatura nos processos fermentativos em estado sólido caracteriza-se por serem exotérmicos, uma vez que grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do microrganismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente na germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado (Pinto, 2003).

O calor gerado pelos microrganismos durante seu crescimento e respiração deve ser dissipado para evitar que haja um aumento de temperatura desfavorável ao processo. Na fermentação no estado sólido, fatores como densidade do micélio, baixo teor de água e ausência de mistura podem favorecer o acúmulo de calor. Para o crescimento dos fungos a temperatura ótima fica entre 20°C e 30°C. (Mitchel & Lonsane, 1992).

O tamanho das partículas do substrato também é considerado um parâmetro essencial para um bom desempenho do cultivo em FES, pois ele está associado ao crescimento de microrganismo, trocas gasosas e disponibilidade de recursos para o consumo do microrganismo. Variações na granulometria resultam em diferentes áreas de contato célula-substrato e podem causar o empacotamento do substrato e limitar a transferência de oxigênio. Por outro lado, partículas grandes proporcionam melhores condições de aeração, mas resultam em menor área de contato limitando o crescimento do microrganismo (Cunha *et al.*, 2012).

A taxa de inóculo é um importante fator na fermentação em estado sólido, pois determinará a biomassa produzida pela fermentação. Portanto, uma quantidade adequada de concentração de inóculo, em relação à quantidade de substrato utilizado, é necessária para garantir a fermentação do meio, suprir a necessidade e não esgotar os nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano, conforme mostra a Figura 6 (Sandhya *et al.*, 2005).





**Figura 6:** Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos (HÖLKER e LENZ, 2005).

Comparada com a fermentação submersa a FES apresenta diversas vantagens tais como economia de espaço, simplicidade nos meios de fermentação, equipamentos simples e de fácil controle, altos rendimentos de produção, menor demanda energética, além de se obter o metabólito de interesse em uma concentração mais elevada (Pinotti *et al.*, 2014). A Tabela 4 abaixo mostra um comparativo entre a FES e a fermentação submersa.

**Tabela 4:** Comparativo entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.

| <b>Fermentação no Estado Sólido</b>                               | <b>Fermentação Submersa</b>                                     |
|---|---|
| Meio de cultura não flui livremente                               | Meio de cultura sempre flui livremente                          |
| Consumo limitado de água, baixa atividade de água, sem efluentes. | Grandes quantidades de consumo de água e descartes de efluentes |
| Baixa capacidade de transferência de calor                        | Fácil controle de temperatura                                   |
| Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato               | Aeração requer elevado fluxo                                    |
| Substrato tampão  | Fácil controle de pH  |
| Altura do meio limitado   | Altura do meio variável com o biorreator                        |
| Equipamentos industriais disponíveis                              | Necessita de projetos   |
| Inoculação de esporos, batelada.                                  | Fácil inoculação, processo contínuo.                            |
| Condições estáticas   | Boa homogeneização  |
| Risco de contaminação por fungos de crescimento lento             | Risco de contaminação por bactérias do ácido láctico            |
| Baixo consumo de energia  | Elevado consumo de energia                                      |
| Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos                  | Grandes volumes e elevado custo tecnológico                     |

Fonte: Holker e Lenz (2004)

Pandey *et al.* (2001) acreditam que a tecnologia de FES não deve ser encarada como uma técnica que substitui a fermentação submersa. Na verdade, cada uma dessas técnicas possui suas potencialidades e particularidades. No entanto, existe o consenso da necessidade de investigação contínua dos fatores relacionados à FES para permitir que o pleno potencial desta tecnologia seja utilizado.

A técnica da fermentação em estado sólido pode ser potencialmente útil para produção de aromas, a tabela 4 mostra vários autores que a utilizaram com os mais variados microrganismos e substratos.

**Tabela 5:** Aplicação da fermentação em estado sólido em diferentes substratos e microrganismos

| Substratos   | Microrganismos                                      | Composto de Aroma  | Referência                     |
|--|---|--|--------------------------------|
| Bagaço de mandioca, bagaço de maçã, amaranto e soja                              | <i>Ceratocystis fimbriata</i>                       | Alcoóis, ésteres, cetonas, ácidos e aldeídos   | Bramorski <i>et al</i> 1998    |
| Soja   | <i>Bacillus subtilis</i>                            | Pirazinas  | Larroche <i>et al</i> 1999     |
| Bagaço de mandioca; bagaço de maçã   | <i>Rhizopus</i>                                     | Acetaldeído, etanol, 1-propanol, acetato de etila, propionato de etila, 3-metil butanol. | Christen <i>et al</i> 2000     |
| Bagaço de cana de açúcar   | <i>Trichoderma harzianum</i>                        | 6-Pentil- $\alpha$ - pirona (6PP)  | Sarhy-Bagnon <i>et al</i> 2000 |
| Casca de café  | <i>Ceratocystis fimbriata</i>                       | Acetaldeído, etanol, isopropanol, acetato de etila                                       | Soares <i>et al</i> 2000       |
| Bagaço de maçã, bagaço de mandioca, cana de açúcar, semente de girassol e palma  | <i>Kluyveromyces marxianus</i>                      | Acetato de etila, etanol, acetaldeído  | Medeiros <i>et al</i> 2000     |
| Bagaço de cana de açúcar   | <i>Trichoderma</i>                                  | 6-Pentil- $\alpha$ - pirona (6PP)  | Araújo <i>et al</i> 2002       |
| Resíduo de café  | <i>Ceratocystis fimbriata</i>                       | Acetato de etila, etanol, acetaldeído  | Medeiros <i>et al</i> 2003     |
| Casca de café  | <i>Ceratocystis fimbriata</i>                       | Acetato de etila, etanol, acetaldeído, Propionato de etila, acetato de isoamila          | Medeiros <i>et al</i> 2006     |
| Pó de casca de coco verde  | <i>Trichoderma harzianum</i>                        | 6-Pentil- $\alpha$ - pirona (6PP)  | Ramos <i>et al</i> 2009        |
| Resíduo de polpa cítrica com farelo de soja, melaço de cana de açúcar            | <i>Ceratocystis fimbriata</i>                       | Acetato de etila, etanol, acetaldeído, acetato de isoamila                               | Rossi <i>et al</i> 2009        |
| Meio sintético   | <i>Antrodia comphorata</i>                          | Lactonas, série de compostos alifáticos  | Lu <i>et al</i> 2011           |
| Bagaço de cana, pó de casca de coco e bagaço de mandioca                         | <i>Trichoderma harzianum</i>                        | 6-Pentil- $\alpha$ - pirona (6PP)  | Calasans 2012                  |
| Soro de leite, melaço, resíduos sólidos de cerveja, resíduos de laranja e batata | <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>S.cerevisae</i> | Ésteres, alcoois, cetonas e terpenos   | Aggelopoulos <i>et al</i> 2014 |
| Borra de café expresso   | <i>Trichoderma harzianum</i>                        | 6-Pentil- $\alpha$ - pirona (6PP)  | Rivera <i>et al</i> 2014       |

Fonte: Galvão, 2014.

## 7- Microrganismos produtores de aromas

As principais fontes de extração de aromas eram de materiais crus, ervas e sementes condimentares, mas devido às questões ecológicas, políticas e a sazonalidade foram se tornando um problema devido à redução de disponibilidade tornando a obtenção com custo alto e oneroso resultando a irregularidade no suprimento do mercado (Chiappini, 2008).

Com a busca por produtos naturais pelos consumidores, o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes e Aromas foi aprovado no Brasil em 2007 (ANVISA, 2007), e define como aromatizantes ou aromas naturais àqueles obtidos mediante métodos físicos, enzimáticos ou microbiológicos a partir de matérias primas naturais. A *International Organization of the Flavor Industry (IOFI)*, órgão representante da indústria mundial de flavorizantes, inclui o uso de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células animais ou vegetais para produção de substâncias flavorizantes naturais (Chiappini, 2008).

Muitos microrganismos são capazes de sintetizar compostos de aroma quando cultivados em meios de cultura adequados, demonstrando sua habilidade de conversão, que pode necessitar de diversas etapas bioquímicas. A maioria dos compostos aromáticos, desejáveis ou não, são subprodutos do metabolismo dos microrganismos produzidos em baixas concentrações (Marioto, 2007).

Em geral fungos e leveduras responsáveis pelo aroma são predominantemente aeróbicos e utilizam carboidratos e ácidos orgânicos e raramente álcool como sua fonte principal de carbono (Bier, 2011).

Alguns registros da utilização de diferentes microrganismos produtores de aroma apresentam-se a seguir na tabela 6:

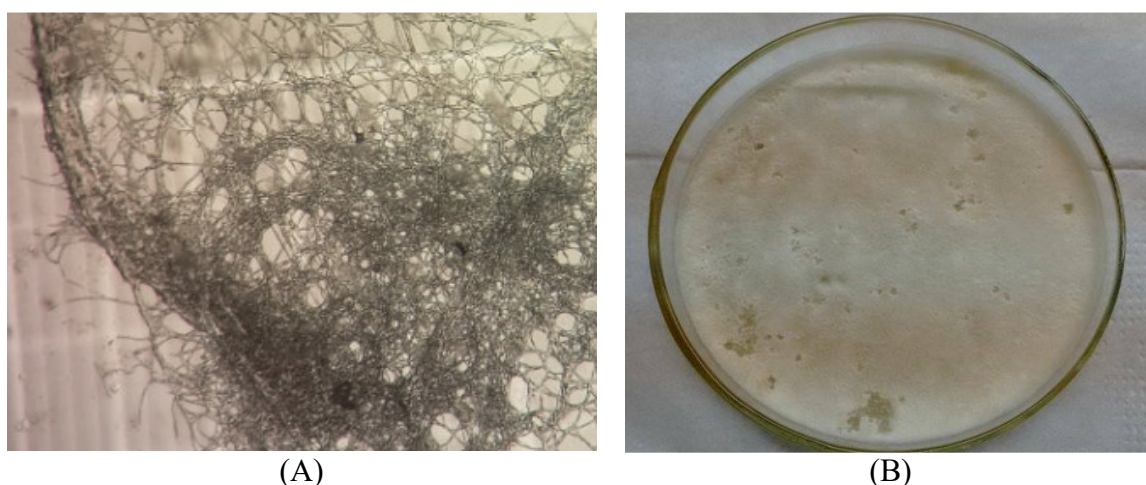
**Tabela 6:** Relação de diferentes micro-organismos na produção de aromas

| <b>Fungos</b>                 |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Microrganismos</b>         | <b>Voláteis Produzidos</b>   |
| <i>Ceratocystis fimbriata</i> | Etil acetato, isoamil  |
| <i>Aspergillus niger</i>      | Geraniol, nerol, citral  |
| <i>Penicillium sp</i>         | $\alpha$ - Terpinol  |
| <i>Trichoderma harzianum</i>  | 6-Pentil- $\alpha$ - pirona  |
| <i>Rhizopus</i>               | Acetaldeído, etanol, 1-propanol, acetato de etila, propionato de etila, 3-metil butanol. |
| <b>Leveduras</b>              |  |
| <b>Microrganismos</b>         | <b>Voláteis Produzidos</b>   |
| <i>Pachysolen tannophilus</i> | Aromas frutais/banana  |
| <i>Kluveromyces marxianus</i> | Acetato de etila, etanol, acetaldeído  |
| <i>S.cerevisae</i>            | alcoois, cetonas   |
| <i>Sporobolomyces sp</i>      | Lactonas   |
| <i>Geotrichum sp</i>          | etil ésteres, álcoois  |
| <i>Hansenula sp</i>           | etil ésteres   |
| <i>Zygosaccharomyces</i>      | Propanololálcool Isobutanol,acetoína   |
| <i>Kloeckera</i>              | Acetoína, 2-acetolactato, 2-3 butanodiol   |
| <b>Bactérias</b>              |  |
| <b>Microrganismos</b>         | <b>Voláteis Produzidos</b>   |
| <i>Bacillus subtilis</i>      | Pirazinas  |
| <i>Streptococcus sp</i>       | Acetaldeído, diacetil, acetoína  |
| <i>Lactobacillus sp</i>       | Acetaldeído, diacetil, ácido láctico.  |
| <i>Propionibacterium sp</i>   | Acetoína e aldeídos  |
| <i>Listeria</i>               | Acetoína, 2-3 butanodiol   |
| <i>Lactococcus</i>            | Acetaldeido,etanol acetona, diacetil   |

Fonte: Adaptado por (MELO, 2001; MARIOTTO, 2007; BIER, 2011)

### 7.1- *Ceratocystis fimbriata*

O gênero *Ceratocystis* contempla diversas espécies distribuídas em vários lugares do mundo. No Brasil ocorrem relatos da existência de três espécies, sendo elas: *C. cacaofunesta*, *C. paradoxa* e *C. fimbriata*, sendo esta última relacionada à doença em culturas de importância econômica, no entanto são bastante utilizadas na obtenção de metabólitos secundários voláteis de grande interesse industrial (Firmino *et al.*, 2014).



**Figura 7:** (A) *Ceratocystis fimbriata* visto no microscópio (20x); (B) *Ceratocystis fimbriata* cultivado em placa de petri no meio Sabouroud.

*C. fimbriata* crescem em uma ampla faixa de pH entre 3,7 e 9,2, tendo um pH ideal de 6,6 e temperatura ótima para o crescimento micelial de 23,0 °C a 28,5 °C, a mais alta de 34,5 °C a 36 °C. Essa espécie de fungo filamentoso vem sendo bastante estudada por apresentar um crescimento relativamente rápido e por serem produtoras de variedades de aromas, como de frutas ou de flores (pêssego, abacaxi, banana, citrus e rosa), dependendo da cepa e das condições de cultivo e se destacam na produção de terpenos e ésteres (Uenojo *et al.*, 2006; Melo, 2007). A tabela 7 demonstra a classificação taxonômica *Ceratocystis fimbriata*

**Tabela 7:** Classificação taxonômica do *C.fimbriata*

| Reino     | Fungi               |
|-----------|---------------------|
| Filo      | Ascomycota          |
| Subfilo   | Pezizomycotina      |
| Classe    | Sordariomycetes     |
| Subclasse | Hypocreomycetidae   |
| Ordem     | Microascales        |
| Família   | Ceratocystidaceae   |
| Gênero    | Ceratocystis        |
| Espécie   | <i>C. fimbriata</i> |

Fonte: [http://zipcodezoo.com/index.php/Ceratocystis\\_fimbriata](http://zipcodezoo.com/index.php/Ceratocystis_fimbriata)

## REFERÊNCIAS

ADITIVOS & INGREDIENTES. Aromas e Biotecnologia. Ed. Insumos, n.82, p. 44-50, setembro, 2011.

AGGELOPOULOS, T; KATSIERIS, K; BEKATOROU, A; PANDEY,A; BANAT, I.M; KOUTINAS, A.A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. Food Chemistry 145. 710–716. 2014.

ALCARDE, A.R.; SOUZA, P.A.; BELLUCO, A.E.S. Chemical profile of sugarcane spirits produced by double distillation methodologies in rectifying still. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.31, p.355-360, 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas. Brasília, Poder Executivo, RESOLUÇÃO Nº 104, DE 14 DE MAIO DE 1999.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas. Brasília, Poder Executivo, RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007.

ARAÚJO, A.A; PASTORE, G.M; BERGER, R.G. Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid state fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.98-100, n.1-9,p.747-751. 2002.

ARAÚJO, L. F. Enriquecimento Proteico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida. Tese (Doutorado) – Programa de Pós - graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 2004.



BAIN & COMPANY GAS ENERGY. Estudo do potencial de diversificação da indústria química brasileira. ISBN 978-85-62690-10-5. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/pdf/estudos-bndes.pdf> Acesso em: 24 de set. 2015.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 4th ed. Weinheim: Wiley – VCH, 293 p. 2001.

BERGAMO et al 2010. Produção do bioaroma acetoina por *Hanseniaspora guilliermondii* CCT3800 através de processo fermentativo. Tuiuti: Ciência e Cultura, n. 43, p. 113-128, Curitiba, 2010.

BEZERRA, J.E. Governança da produção de frutas no nordeste brasileiro: o papel dos supermercados. VI Congresso Iberoamericano de Estudios Territoriales y Ambientales. ISBN: 978-85-7506-232-6. São Paulo. <http://6cieta.org>. 2014.

BICAS, J.L; DIONISIO, A.P; PASTORE, G.M. Bio-oxidation of terpenes: na approach for the flavor industry. Chemical Reviews, v.109, p. 4518-4531. 2009.

BICAS, J. L. Estudos de obtenção de bioaromas pela biotransformação de compostos terpênicos. 219 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas. 2009.

BIER, M.C.J. Produção de compostos de aroma através da biotransformação do limoneno por fermentação em estado sólido utilizando resíduo natural de laranja como substrato. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. 2011.

BLUEMKE, W; SCHARADER, J. Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. Biomol. Eng 17: 137-42. 2001.

BORGES, S. V.; BONILHA, C. C.; MANCINI, M. C. Sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*) e de abóbora (*Curcubita moschata*) desidratadas em diferentes temperaturas e utilizadas como ingredientes em biscoitos tipo cookie. Alim. Nutr., Araraquara, v. 17, n. 3, p. 317-321, 2006.

BRAMORSKI, A. et al. Fruit aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in static cultures from solid agro-industrial wastes. Revista de Microbiologia, v. 28, n. 3, p. 208-212, 1998.

BRIGIDO, B.M. Produção de compostos voláteis de aroma por novas linhagens de *Neurospora* SP. 172 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Campinas. 2000.

CALASANS, P. N. Produção de aroma de coco por *Trichoderma harzianum* a partir do bagaço de cana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2012.

CALDAS NETO, S.F; ZEOULA, L. M; BRANCO, A. F; PRADO, I. N; SANTOS, G. T; FREGADOLLI, F. L; KASSIES, M. P; DALPONTE; A. O. Mandioca e Resíduos das Farinheiras na Alimentação de Ruminantes: Digestibilidade Total e Parcial. Rev. bras. zootec., 29(6): 2099-2108, 2000.

CARVALHO, J. C. Produção de diacetil e acetoina: Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis. 1999.

CEC. Council of the European Union: Council Directive 88/388/EEC of June 1988. Disponível: [http://europa.eu/legislation\\_summaries/others/I21072\\_pt.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/others/I21072_pt.htm).

CHAZIN, E.L. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. Revista Virtual de Química ISSN 1984-6835. Volume 4. Número 6. DOI: 10.5935/1984-6835.20120061. 2012.

CHIAPPINI, C.C. Aromas naturais produzidos por microrganismos. Food Ingredients Brasil, nº 04, 2008.

CHRISTEN, P; BRAMORSKI, A; REVAH, S; SOCCOL, C.R. Characterization of volatile compounds produced by Rhizopus strains grow on agroindustrial solid wastes. Bioresource Technology, v.8, 211-215, 2000.

COELHO, E.M; VIANA, A. C; AZEVEDO, L. C. Prospecção tecnológica para o aproveitamento de resíduos industriais, com foco na indústria de processamento de manga. Congresso Brasileiro de Prospecção Tecnológica. ISSN 1983-1358. (print), 2317-0026 (online), vol.7, n.4, p.550-560 D.O.I.: 10.9771/S.CPROSP.2014.007.056. 2014.

CODEVASF – COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DO PARNAÍBA. Disponível em: <http://www.codevasf.gov.br/noticias/2006/beneficiamento-da-casca-de-coco-em-sergipe/>

COSTA, J.M.G. Eficiência de diferentes encapsulantes e condições operacionais de secagem por atomização na produção e aplicação de micropartículas de bioaroma de queijo suíço. 152 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2013.

CUNHA, F.M; AZARIAS, G.S; ESPÍRITO SANTO, M.C; BADINO, A.C; FARINAS, C.S. Avaliação da influência do tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulasas por *Aspergillus niger* pelo processo de fermentação combinada. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ). Búzios- RJ. 2012.

DAMASO, M.C.T.; PASSIONOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. Brazilian Journal Microbiology, v. 39, p. 676, 2008.

DAMASCENO, S. Cultivo de *Geotrichum fragans* em Manipueira. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciência Agronômicas, UNESP, Botucatu, 1999.

DAMASCENO, S; CEREDA, M.P; PASTORE, G.M; OLIVEIRA, J.G. Compostos de aroma por *Geotrichum fragans* cultivado em manipueira. In: CEREDA, M.P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill. V.4.p. 96-106, 2001.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M.P.; PASTORE, G.M. OLIVEIRA, J.G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. *Process Biochemistry*, v.39, p.411-414, 2003.

DANTAS, E.M; AQUINO, L.C.L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12, n.1, p.81-87, 2010.

DHILLON, G.S; BRAR, S.K; VERMA, M; TYAGI, R.D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v.54, p.83-92, 2011.

DHILLON, G.S; KAUR, S; BRAR, S.K. Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.27, p.789-805, 2013.

DUBAL, S.A; TILKARI, Y. P; MOMIN, S.A; BORKAR, I.V. Biotechnological routes in flavor industries. *Advanced Biotech*, v.20, p.20-31,2008.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biotechnological of plant volatiles. *Plant Physiology*, v.135, p.1893-1902. 2004.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Beauty and Personal Care in Brazil, 2013.

FARIA, P.B; SILVA, J. N; ROFRIGUES, A. Q; TEIXEIRA; P. D; MELO, L. Q; COSTA, S. F; MARQUES, M. F; PEREIRA, R. A. A. Processamento da casca de mandioca na alimentação de ovinos: desempenho, características de carcaça, morfologia ruminal e eficiência econômica. R. Bras. Zootec., v.40, n.12, p.2929-2937, 2011.

FDA. US Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations Title 21. Revisado em 1 de Abril de 2014. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=101.22>

FELIPE, F.I; RIZATO, M; WANDALAZEN, J.V. Potencial econômico dos resíduos de mandioca provenientes de fecularias no Brasil. In: SOBER 47º Congresso Porto Alegre. Anais...Desenvolvimento Rural e Sistemas Agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações, p.1-14, 2009.

FERREIRA, A.N; PACHECO, C. S. V; TAVARES, I. M. C; ROCHA, T. J. O; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido na biotransformação do resíduo do cajá. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba, v. 9, n. 2, p. 207-213, abr./jun. 2011.

FERREIRA, M. S; SILVA, J. R. B. Utilização da casca, entrecasca e raspa da mandioca na alimentação de ruminantes. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v.1, n.2., p.64-66, Dezembro, 2011.

FIB. Food Ingredients Brasil. Revista FI- South American Nº 08. (2009). Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/99.pdf>

FIB. Food Ingredients Brasil. Revista FI- South American Nº 33. (2015). Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/454.pdf>

FIRMINO, A.C; FURTADO, E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 40, n. 4, p. 371-374, 2014.

FUSCO, D.O. Produção de compostos voláteis característicos do aroma em mamões (*Carica papaya* L. cv ‘Golden’) tratados com metil jasmonato e armazenados a

baixa temperatura. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2015.

GALVÃO, M.S. Processo biotecnológico para obtenção dos compostos 2-feniletanol, acetato de 2-feniletil e  $\beta$ -cariofileno pela utilização de resíduo de goiaba. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Ponto focal Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2014.

GARAVAGLIA, J. Bioconversão de l-fenilalanina em 2-feniletanol por *Kluyveromyces marxianus* em mosto de uva. 2006.105f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2/3, p.85-101, 2003.

GRAMINHA, E.B.N; GONÇALVES, A.Z.L; PIROTA, R.D.P.B; BALSALOBRE, M.A.A; DA DILVA, R; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, doi: 10.1016/j.anifeedsci. 2007.09.029.

GUIMARÃES, L.H.S; SOMERA, A.F; TERENCEZI, H.F; POLIZELI, M.L.T.M; JORGE, J.A. Production of  $\beta$ - fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon source: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochemistry*, v.44, p.237-241, 2009.

HÄUSLER, A; MUNCH, T. Microbial production of natural flavours. *ASM-News*, v. 63, p. 551-559, 1997.

HOLKER U.; LENZ J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 24, p.175-186, 2005.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
Estatística da Produção Agrícola.  
[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_%5Bmensal%5D/Comentarios/lspa\\_201403comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Comentarios/lspa_201403comentarios.pdf).

JANSSENS, L De POOTER, H.L; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E.J.  
Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, v.27,p.195-215, 1992.

LANGRAND, G; RONDOT, N; TRIANTAPHYLIDES, C; BARATTI, J.  
*Biotech. Lett.* 12, 581–586. 1990.

LANZA, E; KO.K.H; PALMER, J.K. Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.24, n.6, p.1247-1250, 1976.

LONGO, M.A; SANROMÁN, M.A. Production of Food Aroma Compunds. *Food Technology and Biotechnology*, v.44, n.3, p.335-353, 2006.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. *Enzyme Microbiology Technology*. v.7, p.258-265, 1985.

LOPES, P.R.C; OLIVEIRA, I. V. DE M; SILVA, R. R. S. Avaliação do potencial de produção de frutas de clima temperado no nordeste brasileiro. *Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria*, 16.; AGROFLORES, 11., 2009, Fortaleza. Desafios na exportação e oportunidades no mercado interno: Frutal 2009. Fortaleza: Instituto Frutal, 2009.

LÖSER, C; URIT, T; STUKERT, A; BLEY, T. Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *Journal of Biotechnology*. 163. 17–23. 2013.

LUZ, M.P. Produção de bioaromas pela fermentação de permeado de soro de queijo por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. 2010.

LUCINTEL. Global Flavor and Fragrance Market 2013-2018: Trend, Forecast, and Opportunity Analysis, 2013.

MACEDO, J.S. Aproveitamento dos resíduos do beneficiamento de fibras de coco na obtenção de um eco-material: carbono ativo mesoporoso. Dissertação (Mestrado) – Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Mestrado em Química, Universidade Federal de Sergipe. 2005.

MACIEL, G.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. Tese (Mestrado) Processos Biotecnológicos ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Departamento de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. 2006.

MALAMAN, F.S.; MORAES, L.A.; WEST, C.; FERREIRA, N.J.; OLIVEIRA, A.L.; Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. Food Chemistry, n.124, p.85-92, 2011.

MARIOTTO, J.R. Produção de acetoína e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa*. Tese (Mestrado). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2007.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. de; CORREIA, R. C. Análise evolutiva da produção de coco no estado de sergipe frente ao crescimento da cultura no nordeste e no brasil. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Belo Horizonte, 24 a 27 de julho de 2011.

MEDEIROS, A.P; PANDEY, A. FREITAS, R. J.S, CHRISTEN, P, SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromycesmarxianus*



in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 6. 33–39. (2000).

MEDEIROS, A.B.P; PANDEY, A; CHRISTEN, P; FONTOURA, P.S.G; FREITAS, R.J.S; SOCCOL, C.R. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on packed bed column bioreactor. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, p.767-771, 2001.

MEDEIROS, A. B. P., CHRISTEN, P., ROUSSOS, S., GERN, J. C., & SOCCOL, C. R. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 245-248. 2003.

MEDEIROS, A.B.P.; PANDEY, A.; VANDENBERGUE, L. P. S.; PASTORE, G.M. ; SOCCOL, C.R. Production and Recovery of Aroma Compounds Produced by Solid-State Fermentation Using Different Adsorbents, *Food Technol. Biotechnol* v.1, n.44,p.47-51,2006.

MELLO JR, DARIO DE CARVALHO E. Produção de acetato de etila em biorrefinaria, uma análise de viabilidade / Dario de Carvalho e Mello Júnior. - 2010. 59 f.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Plano Agrícola e Pecuário. Brasília / DF. 2013. [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/acs/PAP20132014-web.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/acs/PAP20132014-web.pdf).

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, characteristics and potential in solis substrate cultivation. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, S. A.; ROLZ, C. E. (Eds.), *Applied Biotechnology Series*. Elsevier, Amsterdam, p.1-16, 1992.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006a.

MUHEIM, A. et al. Microbiological process for producing vanillin. United States Patent 6,235,507. May 22th, 2001.

NASCIMENTO FILHO, W. B; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. *Rev. Virtual Quim* Vol XX.2015.

NIZAMUDDIN, S; SRIDEVI, A; NARASIMHA, G. Production of  $\beta$ -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (8), pp. 1096-1100, 17 April, 2008.

NUNES, R. M; GUARDA E. A; SERRA, J.C; MARTINS, ÁLVARO ALVES. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

OLIVEIRA, L.A; PORTO, A.L.F; TAMBOURGI, E.B. Production of xylanase and protease by *Penicilium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresources Technology*, v.97, p.862-867, 2006.

OLIVEIRA, A. C. D; WATANABE, F. M. F; VARGAS, J.V.C; MARIANO, A. B; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. *Rev. Bras. Tecnol. Agroind.*, v. 06, n. 02, p. 822-831, 2012.

OLIVEIRA, C. A; SOUZA, A. C. J; SANTOS, A. P. B; SILVA, B. V; LACHTER, E. R; PINTO, A. C. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde. *Rev. Virtual Quim.*, 2014, 6 (1), 152-167. Data de publicação na Web: 20 de dezembro de 2013.

ONOFRE, S.B; GROFF, S.A; SARTORI, A; BERTOLINI, J; KAGIMURA, F.Y; ROTTA, D; MAZZALI, L; STEILMANN, P. Production of  $\alpha$ -Amylase and Amyloglucosidase by the Fungus *Cylindrocladium* sp. in Semi-solid State Fermentation. *Journal of Microbiology Research*, 2(5): 123-126. 2012.

OROZCO, A.L; PE'REZ , M.I.; GUEVARA, O.; RODRI'GUEZ, J; HERNA'NDEZ, M; GONZA'LEZ-VILA, F.J; POLVILLO, O; ARIAS, M.E. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. J. Anal. Appl. Pyrolysis 81. 247 - 252. 2008.

PANDEY A., LARROCHE, C. SOCCOL C.R. DUSSAP C.G. Production of aroma compounds. In: Current developments in Solid-state Fermentation. India: Springer. Asiatech publishers, Inc, 2008.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., RODRIGUES-LEON, J. A., NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. Nova Deli, Asiatech, p.221, 2001.

PAROUL, N. Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico. Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2011.

PASTORE, G.M; PARK, Y.K; MIND, D.B. Production of fruity aroma by *Neurospora* from beiju. Mycological Research, v.98, p.1300-1302, 1994.

PATTANAIK, B. N.; MANDALIA, H. C. Ethyl acetate: properties, production processes and applications - a review. International Journal of Current Research and Review 01/2011; 3(12):23-40.

PEREZ-GUERRA, N; TORRADO-AGRASAR, A; LOPEZ MACIAS, C; PASTRANA L. Main Characteristics and Applications of Solid Substrate Fermentation. Electronic Journal of environmental, Agricultural & Food Chemistry. 2 (3): 343-350. 2003.

PINOTTI. L. M; LACERDA, J. X; OLIVEIRA. M. M; TEIXERA, R. D. Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido. XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA- COBEQ. 2014.

PINTO, G. A. S. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2003.

PINTO, G. A. S; BRITO, E. S; SILVA, F. L. H; SANTOS, S. F. M; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. Rev. Quím. Ind., n.724, p.17-20, 2005.

RABENHORST, J.; HOPP, R. Process for the preparation of vanillin and microorganisms suitable therefore. United States Patent 6,133,003. October 17th, 2000.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology.v.1, n.3.p.15.1998.

RAMOS, A.S; MARTINS, P.S.O; FIAUX, S.B; LEITE; S. G. F. Microextração em fase sólida de 6-pentil- $\alpha$ -pirona produzida por fermentação em estado sólido. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(3): 523-528, jul.-set. 2009.

REINECCIUS, G. Flavor Chemistry and Tecnology. Boca Raton: Taylor&Francis, 2006.

ROCHA, G.J.M; MARTIN, C; SOARES, I.B; MAIOR, A.M.S; BAUDEL, H.M; ABREU, C.A.M. Dilute Mixed- Acid Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. Biomass and Bionergy v.35, p. 663-670, 2011.

ROSA, M. F. *et al.* Valorização de resíduos da agroindústria. In: Simpósio internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais – SIGERA, II, 2011, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: Embrapa, v. 1. 2011.

ROSSI, S.C; VANDENBERGHE, L.P.S; PEREIRA, B.M.P; GAGO, F.D; RIZZOLO, J.A; PANDEY, A; SOCCOL, C.R; MEDEIROS, A.B.P. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. Food Research International, v. 42, p. 484–486, 2009.

ROSSI, S.C. Produção de aromas frutais por *ceratocystis fimbriata* cultivado em polpa cítrica, farelo de soja e melaço de cana por fermentação no estado sólido – Determinação da atividade de pectinase (poligalacturonase), esterases e lipase. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos).Universidade Federal do Paraná. 2011.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, v.40, p.2689-2694, 2005.

SANTANA, R. S. M. PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, área de Concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”. Itapetinga Bahia-Brasil 2012.

SANTOS, D. T; SARROUH B. F; SANTOS, J. C; PÉREZ; V. H; SILVA; S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. janus, lorena, ano 3, nº 4, 2º semestre de 2006.

SARHY-BAGNON, V; LOZANO, P; SAUCEDO-CASTAÑEDA,G; ROUSSOS,S.Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. Process Biochemistry, v,36, p.103-109, 2000.

SILVA, J. S; SANTOS, S. da S; GOMES, F. G. G. A biotecnologia como estratégias de reversão de áreas contaminadas por resíduos sólidos. REGET - V. 18 n. 4, p.1361-1370. Dez. 2014.

SOARES, M; CHRISTEN, P; PANDEY, A; SOCCOL, C. R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. Process Biochemistry 35 857–861. 2000.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOUSA, M.S.B; VIEIRA, L. M; SILVA, M. J. M; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, maio/jun., 2011.

SPEZIALI, M.G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do “cheiro” *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 4, 861-864, 2012.

STRAPASSON, R. A. Otimização das variáveis do bioprocesso de fermentação no estado sólido para produção de ácido fumárico a partir de resíduos agroindustriais, utilizando redes neurais. Tese (Doutorado) Processos Biotecnológicos do Departamento de Tecnologia Química. Universidade Federal do Paraná. 2003.

TAMANINI, C; HAULY, M. C. de O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, out./dez. 2004.

UENOJO, M; PASTORE, G.M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(3): 509-515, jul.-set. 2006.

VALDUGA, E; VALERIO, A; TREICHEL, H; NASCIMENTO FILHO, I; JR, A.F; DI LUCCIO, M. Head Space Solid Phase Micro-Extraction (HS - SPME) of volatile organic compounds produced by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(4): 987-992, out.-dez. 2010.

VILHALVA, D.A.A; SOARES JÚNIOR, M; MOURA, C.M.A; CALIARI, M; SOUZA, T. A. C; SILVA, F. A. Aproveitamento da farinha de casca de mandioca na elaboração de pão de forma. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 70(4):514-21. 2011.

VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry*. John Wiley & Sons Inc, 1990.

WOSIACKI, G; CEREDA, M.P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. *Ciencias Exatas e da Terra, C. Agrárias e Engenharias*, 8 (1): 27-43, 2002.

ZOHRE, D.E; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry* v. 38, p. 319- 324. 2002.

## Apresentação dos Capítulos 2, 3 e 4.

O presente trabalho de tese originou dois artigos científicos e um depósito de patente, os quais são apresentados a seguir. Os assuntos abordados giram em torno da produção do composto aromático acetato de etila através do fungo *Ceratocystis fimbriata*. O resíduo utilizado foi à farinha da casca de mandioca e foram avaliados a influencia da quantidade de substrato e a umidade. O processo utilizado para a produção de acetato de etila foi a fermentação em estado sólido e não foi utilizado nenhum tipo de nutriente para enriquecer o resíduo.

O primeiro artigo intitulado: **“Biotechnological process in solid state for production the ethyl acetate compound using cassava rind flour as substrate”** (Processo biotecnológico em estado sólido para produção do composto acetato de etila utilizando farinha de casca de mandioca como substrato) refere-se à produção de acetato de etila pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* através da fermentação sólida da farinha da casca de mandioca. Para execução desse experimento utilizou-se um planejamento experimental  $2^2$  com 3 repetições no ponto central, tendo como variáveis independentes a quantidade de substrato (g) e o teor de umidade (%). O objetivo principal foi avaliar o potencial biotecnológico do resíduo sem adicionar qualquer tipo de solução nutriente o que difere dos outros experimentos para obtenção de acetato de etila.

O segundo artigo intitulado **“Evaluation of ethyl acetate recovery using nacl with direct application in study of increase scale through the fermentative process in state solid”** (Avaliação de recuperação de acetato de etila utilizando NaCl com aplicação direta em estudo de aumento escala através do processo fermentativo em estado sólido) refere-se a avaliação da concentração salina que facilitou a liberação do composto volátil do interior da biomassa. Com este resultado foram feitos testes de aumento de escala e percebeu a influência das condições ambientais proporcionada pelo tamanho do recipiente afetando a umidade e transferência de oxigênio interferindo na produção do acetato de etila.

“A solicitação de concessão da patente intitulada **“Processo biotecnológico em estado sólido para a obtenção do aroma acetato de etila utilizando o microrganismo *Ceratocystis fimbriata* e aproveitando a farinha de casca de mandioca como substrato”** ” foi submetida ao Instituto Nacional da Propriedade



Industrial (INPI) através do Centro de Inovação e Transferência de Tecnologia (CINTEC-UFS) sob o protocolo de número NIB40/2015.

As patentes encontradas geralmente mostram a produção do acetato de etila através da rota química ou utiliza-se um resíduo enriquecido com solução nutriente, o que difere bastante deste trabalho, pois o processo vai aproveitar o potencial do resíduo sem adicionar nenhum tipo de nutriente para enriquecê-lo e produzir um aroma natural.

# BIOTECHNOLOGICAL PROCESS IN SOLID STATE FOR PRODUCTION THE ETHYL ACETATE FLAVOUR USING CASSAVA RIND FLOUR AS SUBSTRATE.

K.B. ARAÚJO<sup>a,\*</sup>, R.C.A. SANTOS<sup>a</sup>, F. C. DAMASCENO<sup>b</sup>, G. F. DA SILVA<sup>c</sup>, A. M. LIMA<sup>d</sup>, R. R. SOUZA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemical Engineering, Federal University of Sergipe

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Federal University of Sergipe

<sup>c</sup>Department of Oil and Gas, Federal University of Sergipe.

<sup>d</sup>Department of Chemical Engineering, Federal University of Sergipe, FAPITEC/CAPES.

\*Corresponding author. Tel.: +55 79 98552120; +55 79 91387838. E-mail address: [kyzzesbarreto@hotmail.com](mailto:kyzzesbarreto@hotmail.com) (K.B. ARAÚJO)

## ABSTRACT

The development of biotechnological processes is one of the promising means for producing metabolites of industrial interest, such as the production of flavors. The filamentous fungus of the genus *Ceratocystis* is able of synthesizes simple esters and produces compounds of aromas, such as ethyl acetate responsible for fruit aroma. This study evaluated the production of ethyl acetate produced by *Ceratocystis fimbriata* using cassava rind flour as substrate without added nutrients. An experimental project evaluated the influence of the amount of residue (g) and humidity (%) on the value of production of ethyl acetate based on the response surface methodology (RSM). The studies were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks, incubated in a 28 ° C and inoculated with 1x10<sup>6</sup> spores / g dry matter, for 6 days. The biomass and substrate consumption were also evaluated and the ethyl acetate was quantified by gas chromatography. The best production of ethyl acetate was detected with 50% moisture in a mass of 14,23 g of dry matter of 48 h of fermentation. The results show that the interaction between mass and moisture was significant influencing in the production of ethyl acetate, most relevance to the variable moisture.

Keywords: solid state fermentation, *ceratocystis fimbriata*, ethyl acetate, cassava rind flour

## 1- Introduction

The world population has grown wildly in recent decades with technological development, providing an environmental imbalance by increasing the production of solid waste that are excellent substrates, rich in sugars and fiber, with a high added nutritional value such as straw, bark, stems, stalks and waste pulp industries (Nunes et al., 2013; Silva et al., 2014).

The amount of waste generated by the food industry in Brazil is about 250 million tons. year<sup>-1</sup> because of its great potential for the production of renewable resources and may have a more beneficial purpose to man and the environment. Cassava is one of the most widespread crops in Brazil and one of the main foods of millions of people in tropical countries. No one knows for sure the total amount of waste generated from the industrialization of cassava, but about 10 % of the total cassava used to make flour is eliminated in the form of rind (Caldas Neto et al., 2000; Tamanini et al., 2004; Ferreira et al., 2011; Nascimento et al., 2015).

The use of agricultural residues with biotechnological innovation results in the production of various chemical compounds of industrial interest such as ethanol, proteins, enzymes, organic acids, amino acids, biologically active secondary metabolites and aroma compounds, as well as assist in the excess solution of disposal of these substrates (Medeiros et al., 2000).

One of the main characteristics of the SSF (Solid State Fermentation) is the use of simple wastes like nutrients necessary for the growth of the microorganism between the fragments of the substrate or on the surface of the substrate, consuming it and secreting metabolites (Oliveira et al., 2012; Mitchell et al., 2006a ; Ferreira et al., 2011).

The filamentous fungi are the major microorganisms grown on solid medium due to their ease of development at very low humidity and synthesize aromatic compounds when cultured in appropriate culture media. *Ceratocystis fimbriata* is a species of filamentous fungi has been widely studied for presenting a relatively rapid growth and to be producers esters and varieties of flowers or fruit flavorings (Uenojo et al., 2006; Rossi et al., 2009).

The ethyl acetate is a highly volatile ester widely used in the food industry as a beverage flavoring, such as organic solvent used in organic synthesis laboratories and

pharmaceutical industry, as solvent extraction and the concentration and purification of antibiotics (Pattanaik et al., 2011).

This study evaluated the production of ethyl acetate by solid state fermentation by the fungus *Ceratocystis fimbriata* using as substrate cassava rind flour without addition of nutrient solution in order to enjoy the biotechnological potential of the residue. The experiment evaluated the influence of the amount of substrate mass and moisture in the production of ethyl acetate based on Response Surface Methodology.

## **2- Material and methods**

### **2.1- Chemical composition of the substrate**

The chemical composition of cassava rind flour was determined as described by IAL (Adolf Lutz Institute).

### **2.2- Microorganism and inoculum**

*Ceratocystis fimbriata* 1271, acquired from culture collection André Torsello Foundation (Campinas - São Paulo - Brazil), was grown and periodically transferred to Saboraud Ágar. A spore suspension was prepared after a 5-day culture at 28°C in petri dish. Spores were collected with malt extract. The spore suspension contained  $1 \times 10^6$  spores.mL<sup>-1</sup>, as determined using the Neubauer's chamber.

### **2.3-Substrate preparation**

Cassava hull were oven dried at 60°C for 8 h. The dried substrates were then milled and sieved to obtain particles of 0.82 mm size. Cassava rind flour was weighed in 250 mL erlenmeyer flasks in accordance with the experimental design and sterilized in an autoclave at 121°C for 15 minutes.

### **2.4-Fermentation procedure**

Experiments were conducted in 250 mL erlenmeyer flasks. Initial water content was calculated according to the maximum absorption capacity of support. The residue was moistened with a volume of water which corresponds the moisture applied in accordance with the experimental design and 1 mL of spore suspension containing  $10^6$

spores.mL<sup>-1</sup>. All the flasks were incubated at 28°C for 6 days in static conditions. The influence of the process parameters on *Ceratocystis fimbriata* to produce aroma compounds was tested performing a 2<sup>2</sup> statistical experimental design, 4 axial points and three repetitions at the central point varying respectively weight of the residue (g) and moisture (%). The parameters tested were statistically analyzed with Statistic 8.0 – Statsoft. The different levels of each parameter tested (weight of the residue and moisture) are given in Table 1.

**Table 1:** Design matrix central composite rotational employed in the study of the production of ethyl acetate by Solid state fermentation.

| Independent Variable | Level |    |    |    |       |
|----------------------|-------|----|----|----|-------|
|                      | -1,41 | -1 | 0  | +1 | +1,41 |
| Weight (g)           | 5,7   | 7  | 10 | 13 | 14,23 |
| Moisture (%)         | 35,9  | 40 | 50 | 60 | 64,1  |

## 2.5-Analytical procedures

Every 24 h, all residues was centrifuged with distilled water at 3400 rpm for 10 minutes. 5 mL aliquots of the supernatant were transferred into headspace vial and stored at -20 °C until the time of analysis. The precipitate was used to determine the fungal biomass, dried at 105 ± 2 °C, to constant weight (Urit et al., 2011). Sugar was quantified as reducing sugars and total reducing sugars by the DNS method (Miller, 1959).

## 2.6- Chromatographic Analysis

Ethyl acetate was measured in the headspace of the culture by gas chromatography (GC) analysis performed, Shimadzu, GC 2010. The model was used RTX-5 column (30 m length x 0.32 mm diameter x 0,1 µm thick) with automatic injector Shimadzu, model AOC -5000. The injections were performed automatically with the headspace method, and injection volume of 750 µL and a 1:10 split ratio. The carrier gas was helium (99,999% pure) at a flow of 1 mL.min<sup>-1</sup>. The oven temperature was programmed: initiation at 60 °C initially, increased at a 5 °C.min<sup>-1</sup> to 80 °C and

then 20 °C.min<sup>-1</sup> to 150 °C (Medeiros et al., 2006). Before injection, the sample was stirred at 600 rpm for 10 minutes at 60 °C. The temperature of the syringe was 80 °C. The standard curve was used to identify microbial aroma compound.

### 3- Results and discussion

#### 3.1- Substrate

The physical-chemical analysis of cassava rind flour (Table 2) shows that the concentration of starch and total and reducing sugars associate to the amount of protein and minerals indicate that the substrate has a potential source of carbon and nutrients necessary for the development of a fermentation solid without supplementation of nutrient salts.

**Table 2:** Compositions of cassava rind flour.

| Components                      | Results      |
|---------------------------------|--------------|
| pH                              | 5,78 ± 0,01  |
| Moisture (%)                    | 8,04 ± 0,16  |
| Lipids (g/100 g)                | 0,85 ± 0,04  |
| Proteins (g/100 g)              | 7,14 ± 0,14  |
| Ash (g/100 g)                   | 3,10 ± 0,03  |
| Fibres (g/100 g)                | 9,02 ± 0,11  |
| Reducing sugars (g/100 g)       | 4,95 ± 0,17  |
| Total Reducing sugars (g/100 g) | 40,16 ± 1,66 |
| Starch (g/100 g)                | 50,95 ± 0,33 |

#### 3.2 – Ethyl acetate production

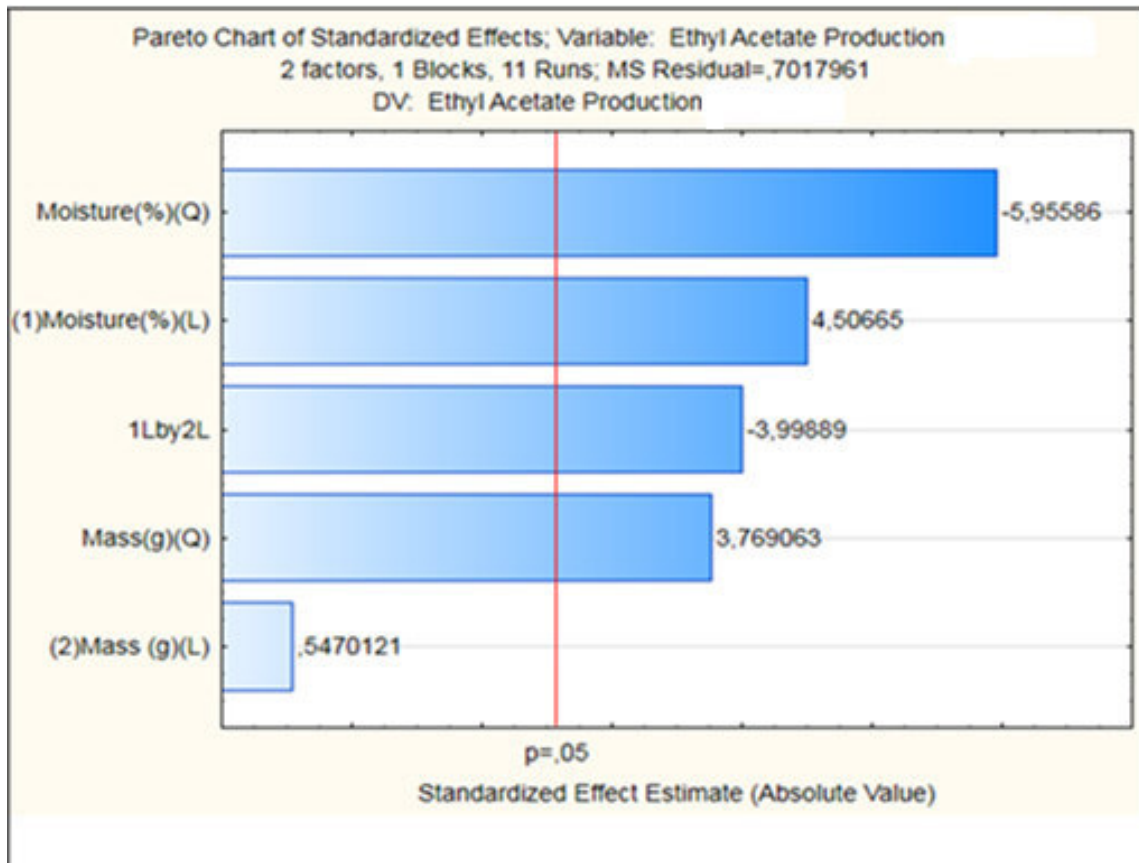
The tests conducted in accordance with the proposed experimental design revealed that higher concentrations of ethyl acetate occurred at 48 h of fermentation, especially the test 8 (Table 3).

**Table 3:** Values obtained from experimental design for solid state fermentation in 48 h of fermentation.

| Tests | Moisture (%) |       | Mass (g) |       | Ethyl acetate ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | Biomass (g/g ms) | Moisture (%) | Total Sugars (mg/g ms) | Reducing Sugars (mg/g ms) |
|-------|--------------|-------|----------|-------|--|------------------|--------------|------------------------|---------------------------|
|       | Level        | Value | Level    | Value |  |                  |              |                        |                           |
| 01    | -1           | 40    | -1       | 7     | 0  | 0,494            | 32,96        | 21,88                  | 4,35                      |
| 02    | +1           | 60    | -1       | 7     | 80,57                                    | 0,510            | 55,03        | 36,59                  | 4,00                      |
| 03    | -1           | 40    | +1       | 13    | 43,12                                    | 0,684            | 39,87        | 21,85                  | 2,90                      |
| 04    | +1           | 60    | +1       | 13    | 47,66                                    | 0,698            | 58,30        | 19,37                  | 2,70                      |
| 05    | -1,41        | 35,9  | 0        | 10    | 0  | 0,570            | 30,70        | 23,64                  | 4,00                      |
| 06    | +1,41        | 64,1  | 0        | 10    | 26,10                                    | 0,629            | 53,82        | 25,93                  | 3,87                      |
| 07    | 0            | 50    | -1,41    | 5,7   | 89,65                                    | 0,551            | 49,40        | 37,16                  | 3,82                      |
| 08    | 0            | 50    | +1,41    | 14,23 | 91,92                                    | 0,688            | 49,40        | 26,06                  | 2,75                      |
| 09    | 0            | 50    | 0        | 10    | 56,74                                    | 0,679            | 48,26        | 28,32                  | 4,08                      |
| 10    | 0            | 50    | 0        | 10    | 55,61                                    | 0,670            | 48,41        | 25,24                  | 3,84                      |
| 11    | 0            | 50    | 0        | 10    | 56,74                                    | 0,683            | 48,45        | 25,55                  | 4,10                      |

This experimental design was tested moisture and substrate mass. The response variable of greatest interest was the concentration of ethyl acetate produced by fermentation, but other evaluations were conducted simultaneously related to the production (biomass, final moisture, total and reducing sugars). The effects of the independent variables, moisture and mass, in relation to the production of ethyl acetate (dependent variable) are indicated on the Pareto chart (Figure 1) at the level of 5 % of significance.

The effects of mass and moisture and their interaction were significant influencing the production of the compound (ethyl acetate), with greater relevance to the variable moisture.



**Figure 1:** Pareto chart of effects for the  $2^2$  experimental design with cassava rind flour.

Based on Table 4, was developed the codified second order model which relates the production of ethyl acetate ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) as a function of moisture ( $x_1$ ) and mass ( $x_2$ ), which is shown in equation  $y = 4,96278 + 1,33918x_1 - 2,12180 x_1^2 + 1,31685x_2^2 - 1,67500 x_1x_2$ .

**Table 4:** Regression coefficient for ethyl acetate production in cassava rind flour.

| Factor          | Coeff    | Std. Error | t(5)     | p        | -95% Cnf.Limit | +95% Cnf.Limit |
|-----------------|----------|------------|----------|----------|----------------|----------------|
| Mean            | 4,96278  | 0,483639   | 10,26133 | 0,000151 | 3,71955        | 6,20602        |
| Moisture (L)    | 1,33918  | 0,594315   | 4,50665  | 0,006360 | 0,57532        | 2,10305        |
| Moisture (Q)    | -2,12180 | 0,712507   | -5,95586 | 0,001908 | -3,03758       | -1,20602       |
| Mass (L)        | 0,16161  | 0,590892   | 0,54701  | 0,607888 | -0,59786       | 0,92108        |
| Mass (Q)        | 1,31685  | 0,698768   | 3,76906  | 0,013035 | 0,41873        | 2,21497        |
| Moisture x Mass | -1,67500 | 0,837733   | -3,99889 | 0,010335 | -2,75173       | -0,59827       |



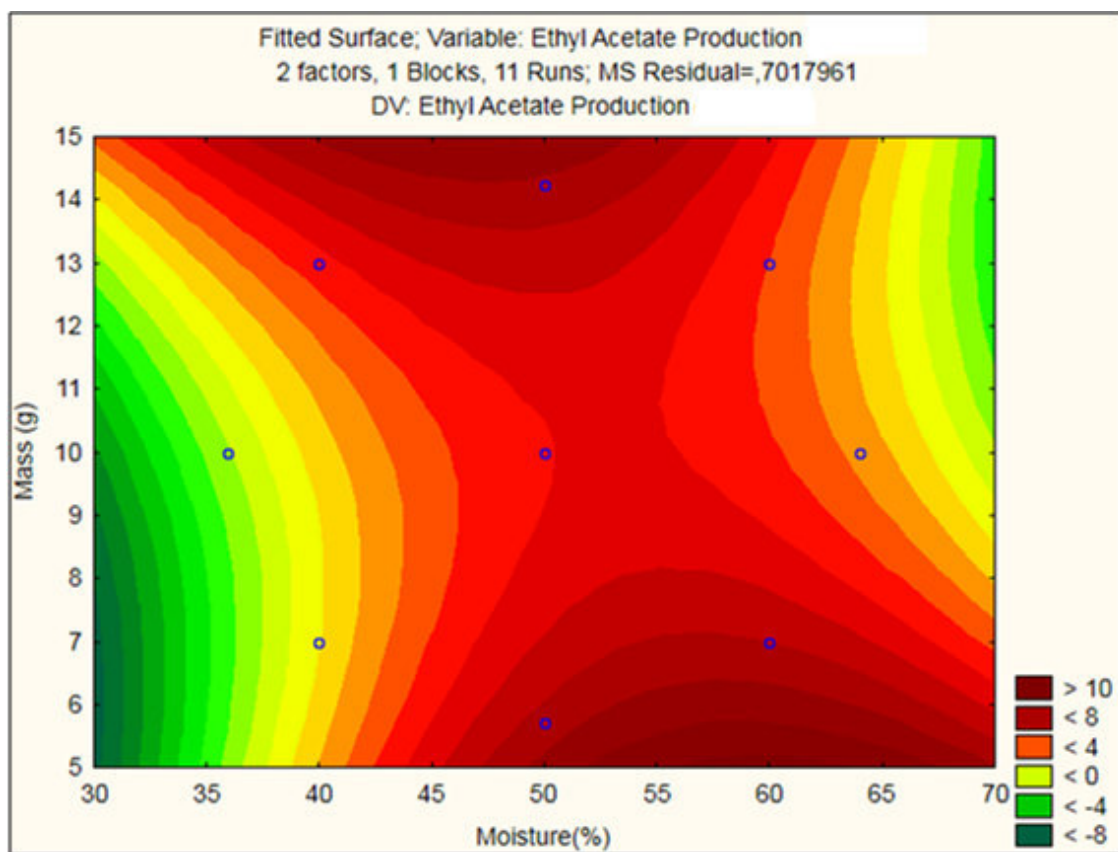
Analysing ANOVA table (Table 5), the  $F_{\text{calc}}$  for regression (24,3) is highly significant and the percentage of variance explained ( $R^2$ ) was considered very good (94,19%), it is concluded that the model fits well to the experimental data being possible generate the response surface.

| Source            | SS       | DF | MS       | Fcal | p-value  |
|-------------------|----------|----|----------|------|----------|
| <b>Treatments</b> | 60,33981 | 4  | 15,08495 | 24,3 | < 0,0001 |
| <b>Error</b>      | 3,71897  | 6  | 0,619828 |      |          |
| <b>Total</b>      | 64,05878 | 10 |          |      |          |

**Table 5:** ANOVA for ethyl acetate production in cassava rind flour.

% variance explained ( $R^2$ ) = 94,19;  $F_{4,6; 0,05} = 4,53$

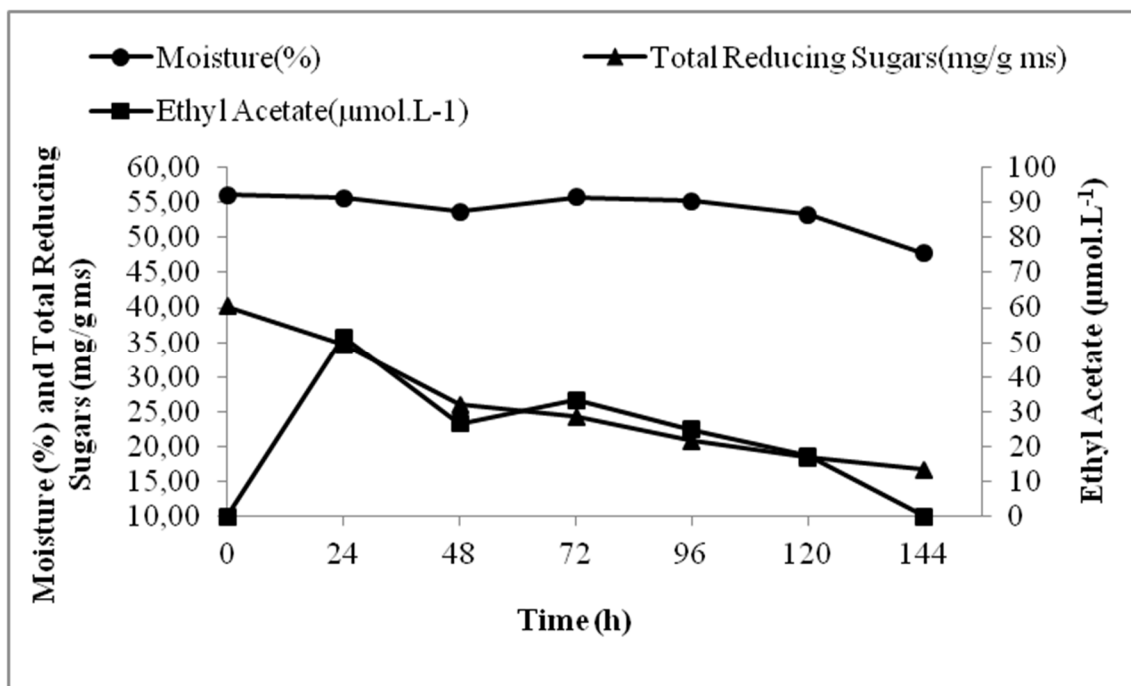
The level curves (Figure 2) reflect the trends indicated by full experimental design where the influence of moisture applied to the substrate in obtaining ethyl acetate was more pronounced in the values between 50 % and 65 %, as the substrate mass used in the tests the values that favor the production of the compound are in two regions, ranging between 5,5 g and 7 g, and values between 14 g and 15 g, this behavior can be attributed to the effects of interaction between moisture and mass pointed in the Pareto chart.



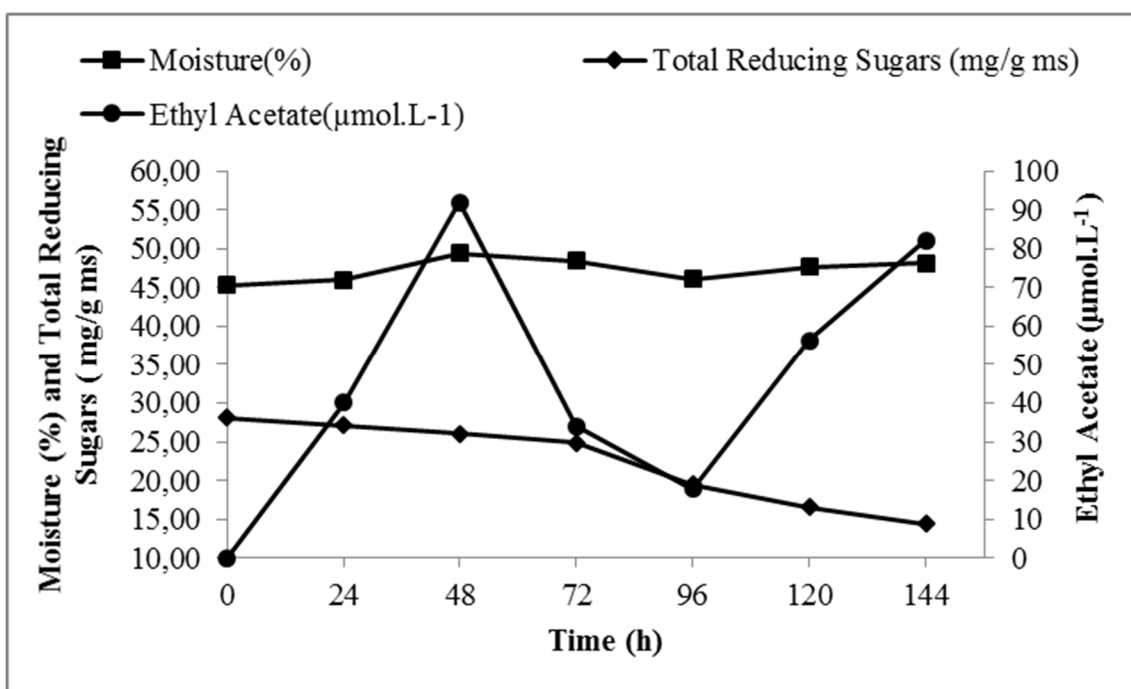
**Figure 2:** Response Surface for the  $2^2$  experimental design with cassava rind flour.

Several factors may have influenced the test 8 as moisture, because the volume of water added in a mass of 14,23 g create a surface layer of water facilitating dissolution and mass transfer of nutrients and oxygen. Already the test 6 (64,1 %; 10 g ) obtained smaller value ethyl acetate because the volume of water added was greater in a smaller amount of mass (10 g) resulting in the decrease of the substrate porosity, low diffusion of oxygen and reduction gas exchange influencing the production of ethyl acetate.

The production behavior of ethyl acetate, moisture and sugar consumption in 48 hours of fermentation in the tests 6 and 8, respectively, are shown in Figure 3A and 3B.



3A



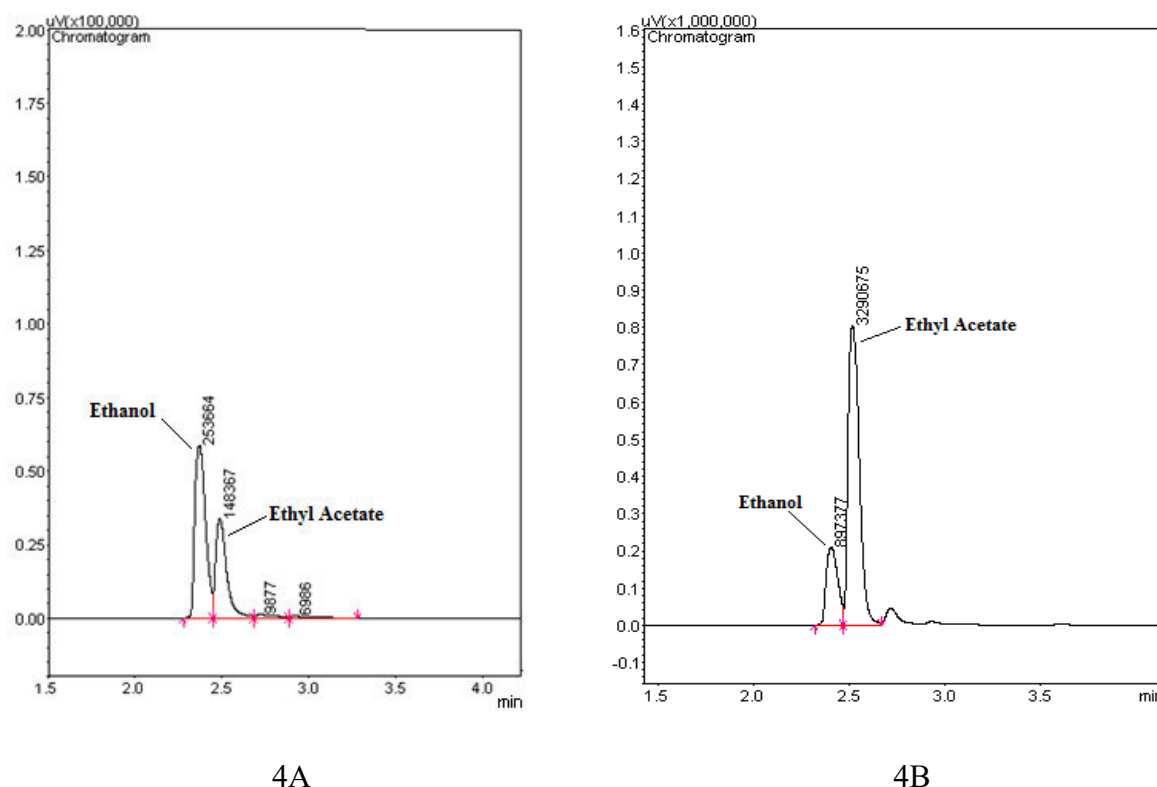
3B

**Figure 3:** (A) Kinetics of production of ethyl acetate, moisture and consumption of total sugars produced in cassava rind flour in SSF test 6 (64, 1%; 10 g). (B) Kinetics of production of ethyl acetate, moisture and consumption of total sugars produced in cassava rind flour in SSF test 8 (50%; 14, 23 g).

In test 6 (Figure 3A) shows a similarity between the behavior of moisture and the production of ethyl acetate whose production had a rapid increase in 24 h of fermentation ( $51,52 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). However the production of aroma components falls to practically zero, because the reducing sugars used in the biosynthesis of alcohols and esters have been rapidly consumed during the fermentation until the time of 144 h from  $4,60 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ms}$  to  $1,49 \text{ mg.g}^{-1} \text{ ms}$ .

While in test 8 (Figure 3B) shows that the ethyl acetate production behavior reached its maximum in two stages, initially for 48 h fermentation ( $91,92 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) when there is an increase in moisture and the presence nutrients for the production of the compound and then, in the course of the fermentation, there is a reduction as much moisture as the consumption of reducing sugars ( $3,33 \text{ mg/g ms}$  to  $1,43 \text{ mg/g ms}$ ) affecting the production of ethyl acetate. Even with the decrease in sugar rates there is sufficient nutrient for the production of aroma, because perceives a second moment that there was an increased production of acetate in 144 h of fermentation ( $82,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), and that It has a greater influence of moisture increase that occurs through the breathing process, which results in the release of water that is not lost to the environment.

The respective chromatograms can be seen in Figures 4A and 4B.



**Figure 4:** (A) Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 6 (64, 1%; 10 g). (B) Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 8 (50%; 14, 23 g).

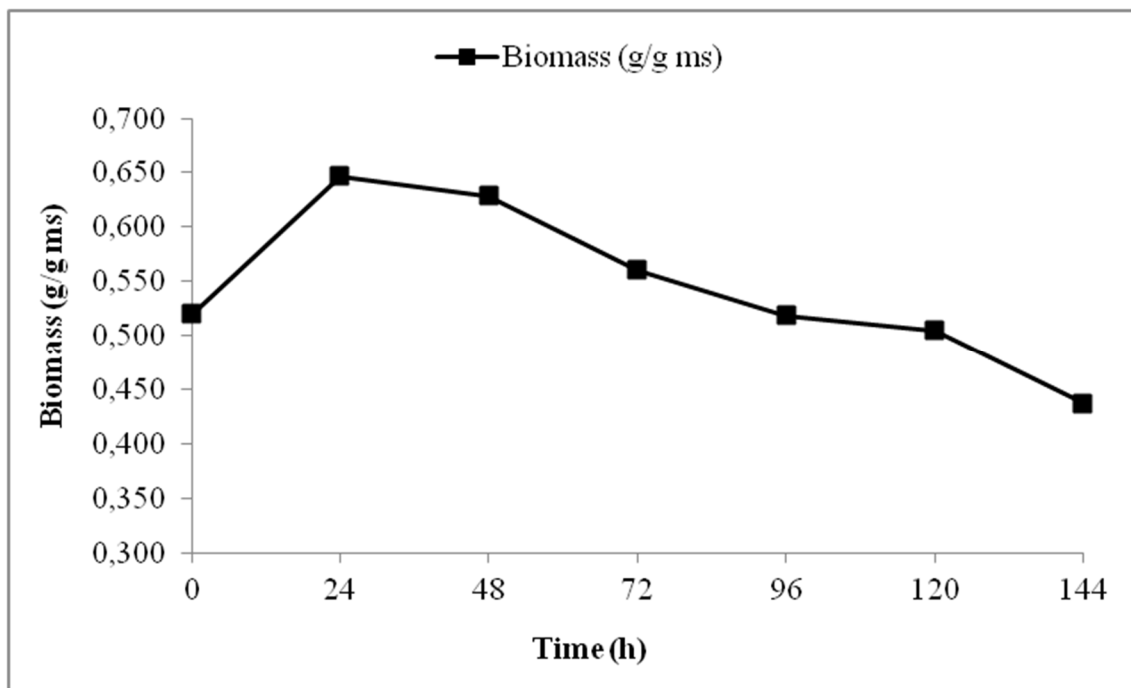
It is noteworthy that the aromas produced by microorganisms are secondary metabolites, in other words, require long fermentation periods reflecting in its production due to the higher risk of contamination by undesirable microorganisms in the process. The production of ethyl acetate is directly proportional to the production of alcohols and it is necessary that the aeration and the concentration of ethanol appear as key elements in the regulation of aldehyde dehydrogenase enzyme that leads to production of the ester, acetate.

Christen et al., (1997) used *Ceratocystis fimbriata* with three substrates: wheat bran (50% of initial moisture), cassava bagasse (63% of initial moisture) and sugarcane bagasse (63% of initial moisture) complemented with a synthetic medium. They produced only  $4,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , about  $23,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and  $26 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of ethyl acetate, respectively. Soares et al., (2000) produced ethyl acetate with *C. fimbriata* by solid state fermentation using coffee husk with 70% of initial water supplemented with

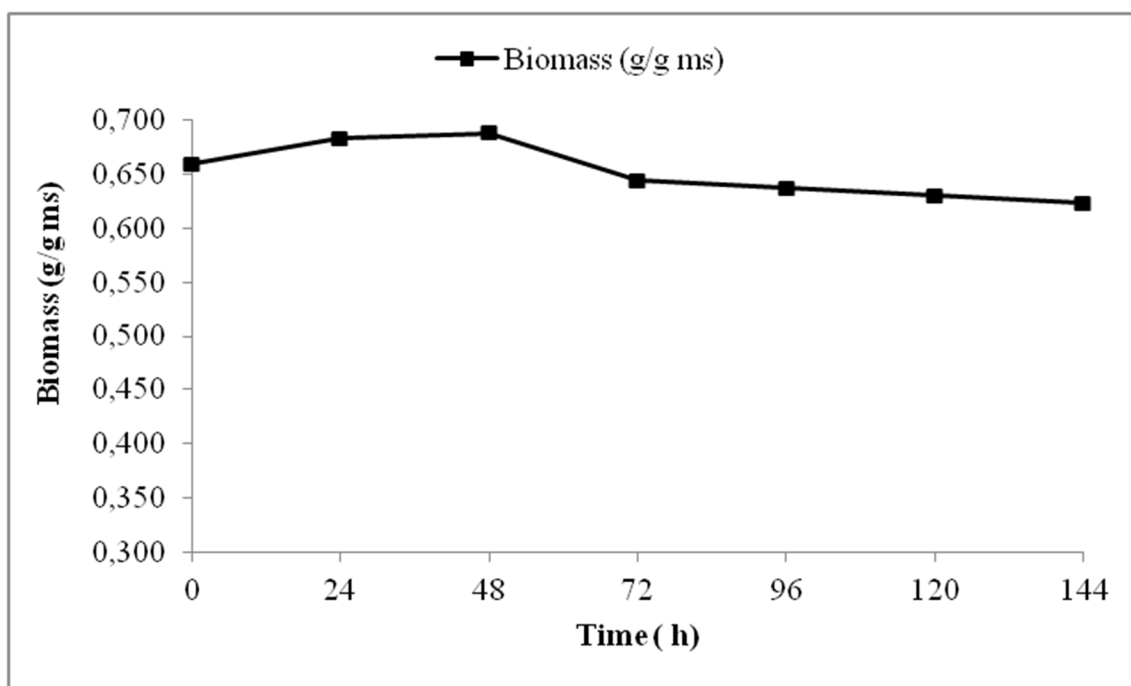
glucose and the concentrations of compound was obtained 80,5%. They observed that the higher concentration of glucose limited in terms of aroma intensity. Medeiros et al., (2003) produced fruity aroma by solid state fermentation (SSF) and was tested on coffee husk, treated coffee husk, coffee pulp and treated coffee pulp with 70% of initial moisture complemented with glucose 20%. The concentration of ethyl acetate was obtained respectively about 24,5  $\mu\text{mol/L.g}$ , 26  $\mu\text{mol/L.g}$ , 10,4  $\mu\text{mol/L.g}$  and 3,8  $\mu\text{mol/L.g}$  after 72 h, with *C. fimbriata* CBS 374. Rossi et al., (2009) produced ethyl acetate using citrus pulp, soybean meal and molasses with 75% initial moisture and the maximum production of total volatile reached 62  $\mu\text{mol/L.g}$  obtained after 48 h. Other researchers produced ethyl acetate using other microorganisms. Medeiros et al., (2000) added glucose 10% to cassava bagasse and palm bran and produced 1395  $\mu\text{mol/L.g}$  and 251  $\mu\text{mol/L.g}$  of ethyl acetate in 72 h using *Kluyveromyces marxianus* ATCC10022. Christen et al., (2000 ) tested the use of different substrates ( cassava bagasse , soybean, soybean and apple pomace oil) , but with *A. oryzae* and achieved a maximum of 40 mmol / L.gs in 36 h and when this was added to a mixture of these substrates could amaranth grains 18.66 mmol / L.gs

With regard to the behavior of the biomass, *Ceratocystis fimbriata* grew up in the test 8 (0, 688  $\text{g.g}^{-1} \text{ ms}$ ) in 48 h of fermentation and its reduction was not as significant as shown in Figure 5B. It is possible that this behavior influenced the production of ethyl acetate at the end of fermentation (Figure 3B), since there are still satisfactory conditions of moisture and the available amount of sugar for producing compound.

In the test 6 ( Figure 5A) the biomass was higher (0.646  $\text{g.g}^{-1} \text{ ms}$ ) for 24 h and then shows a rapid fall in biomass due to the conditions of fermentation , as the moisture that was not satisfactory for the growth of the culture. Given these behaviors, it is perceives that there is an optimum moisture for the production of compounds in solid substrates, which does not necessarily coincide with the value that corresponds to the maximum cell concentration



5A



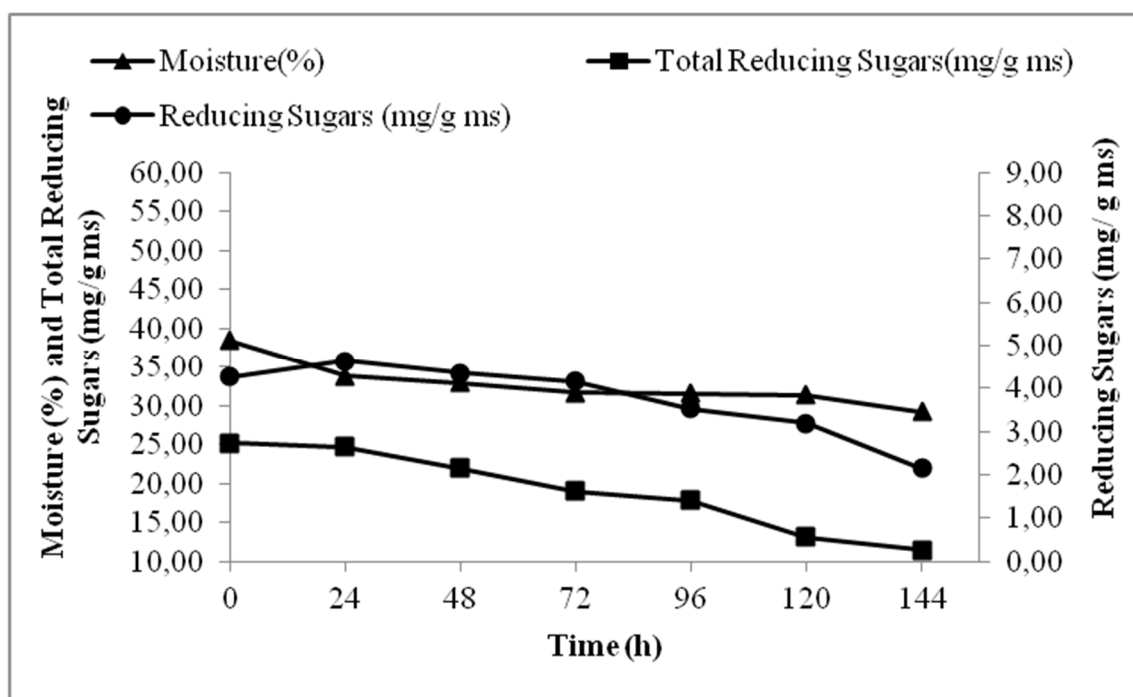
5B

**Figure 5:** (A) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour ensaio 6 (64,1% - 10g). (B) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour ensaio 8 (50% - 14,23g).

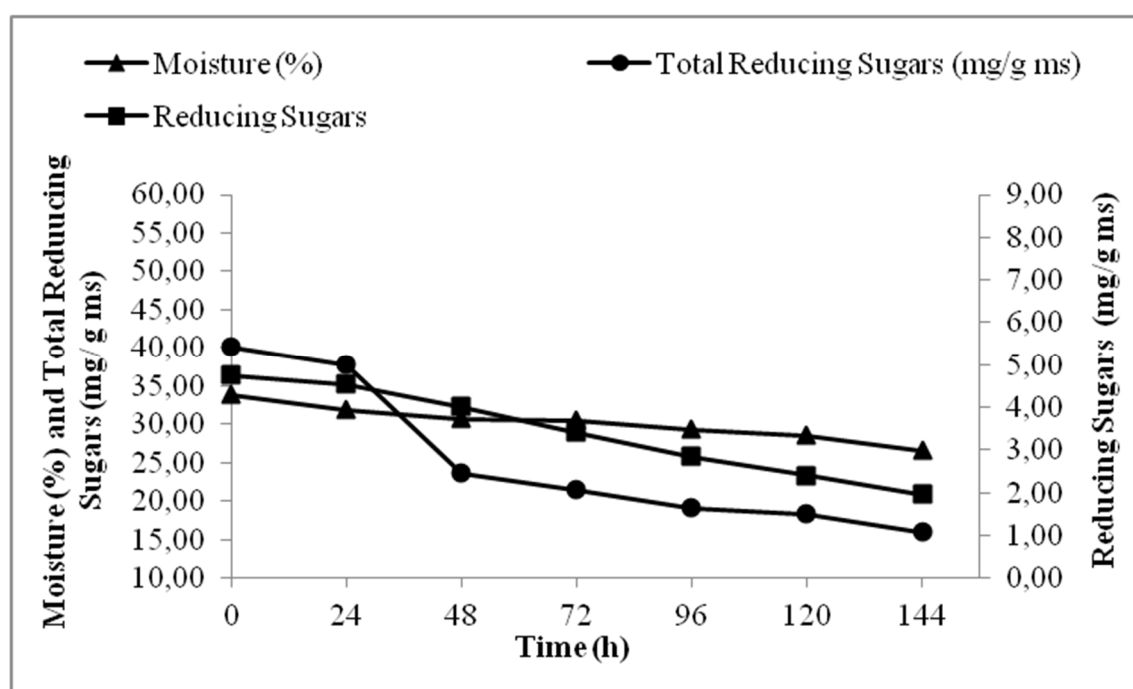
Medeiros et al., (2003) reaches the maximum biomass in 96 h, remaining stable until the end of fermentation, even without more volatile production. Rossi et al., (2009) observed that the highest biomass concentration was 0.58 g /g ms in 144 h of fermentation, because there was a very large and rapidly growing due to germination spores with the formation of mycelium at this stage the FES. However the production of aroma components is fully lowered, due the simple sugars used in the biosynthesis of volatile compounds have been consumed.

The tests 1 and 5 do not produce the ethyl acetate compound during the entire study period of fermentation (144 h), Figures 6A and 6B show the behavior observed in biomass production and consumption of sugars.





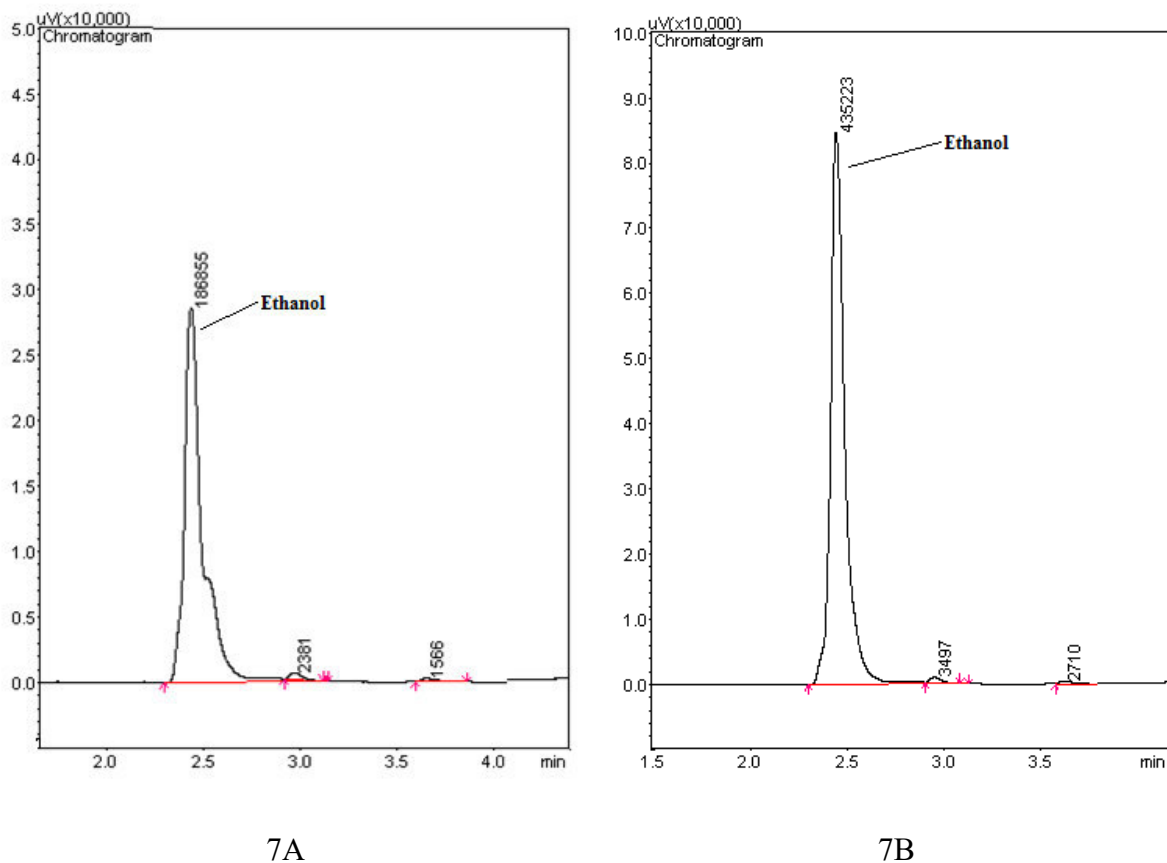
6A



6B

**Figure 6:** (A) Kinetics of moisture behavior and consumption of total and reducers sugars produced in cassava rind flour in SSF test 1 (40%; 7g). (B) Kinetics of moisture behavior and consumption of total and reducers sugars produced in cassava rind flour in SSF test 5 (35, 9%; 10 g).

It is possible that the amount of water added in these experiments was not favorable for the production of ethyl. Excess water in trial 1 (Figure 6A ) may be involved in the reduction of the substrate porosity reducing gas exchange, since the low humidity in the test 5 (Figure 6B) impeded the diffusion of nutrients resulting in less growth of a microorganism in a large amount of mass ( 10g ). Their respective chromatograms can be seen in Figures 7A and 7B.

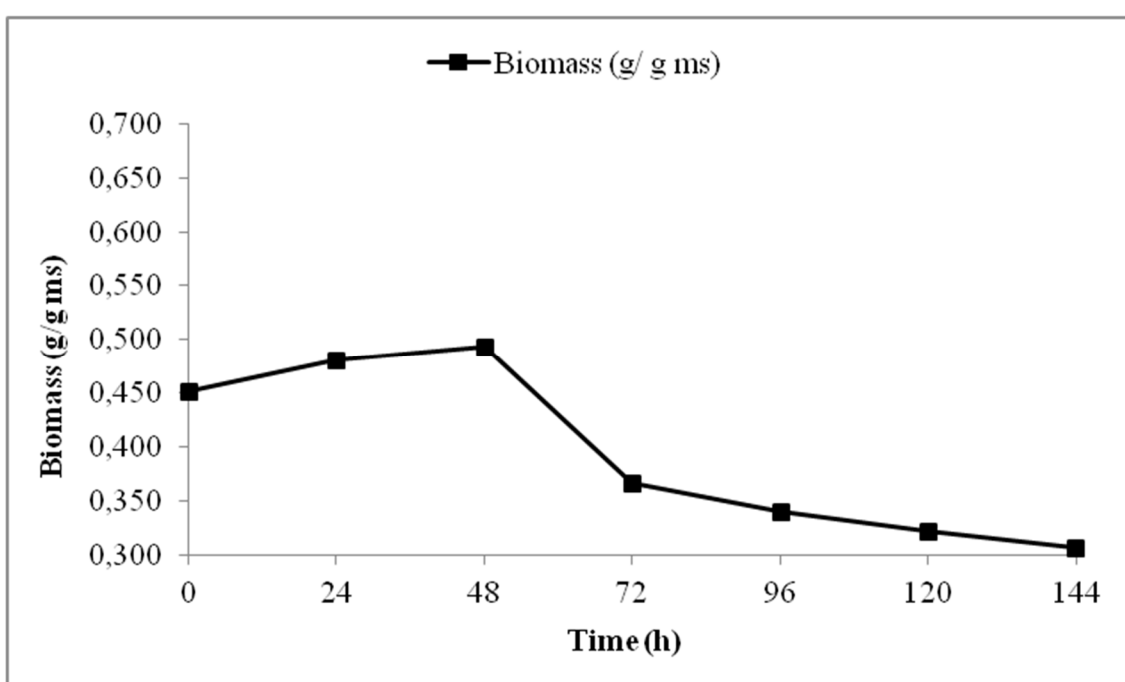


**Figure 7:** (A) Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 1 (40%; 7g). (B) Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF test 5 (35,9%; 10 g).

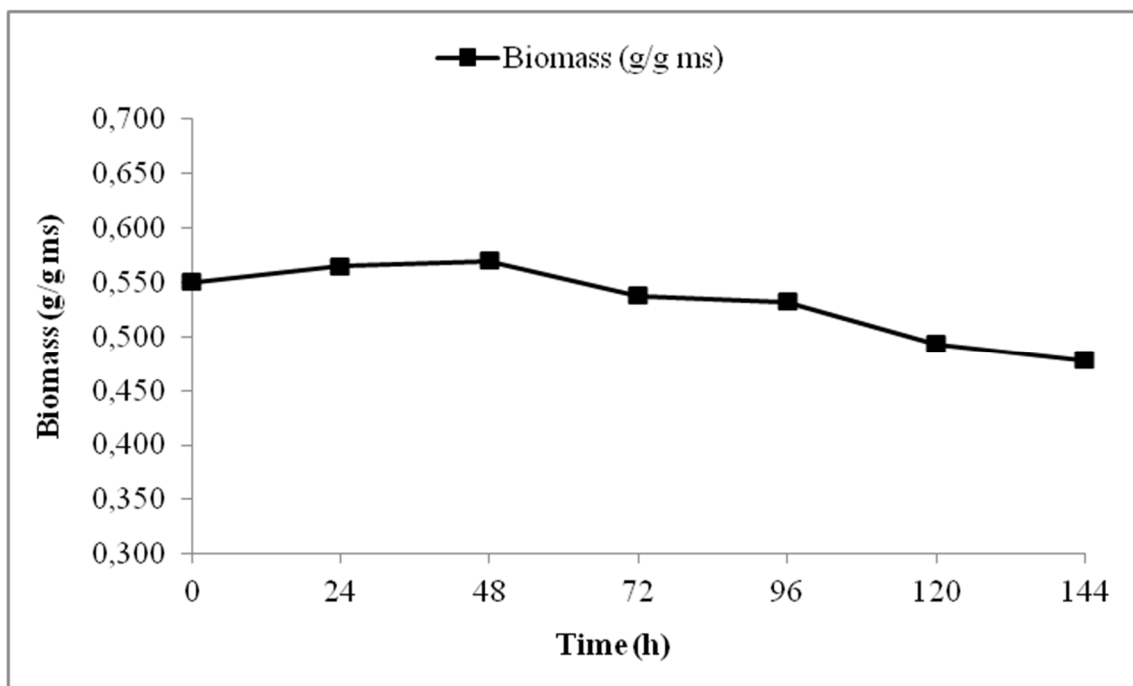
Throughout the fermentation these experiments can perceive a disadvantage in the production of esters such as moisture loss due to evaporation and microbial metabolic activities hindering gas exchange. As can be seen in Figure 7, the fermentation conditions favoring the production of ethanol.

The ethanol conversion process in ethyl acetate is limited by the concentration of oxygen present in the medium. According with the glycolytic pathway, ethanol is formed when the process is in anaerobiosis. However, the reactions are reversible and are controlled by the concentration of dissolved oxygen in the middle. Depending on the concentration of this nutrient, ethanol is oxidized to acetaldehyde and consecutively in ethyl acetate. However, if higher concentrations of oxygen are present, will occur in the formation of acetyl- CoA.

Regarding to the behavior of the biomass, Figures 8A and 8B show that there was an increase in 48 h of fermentation even without the production of ethyl acetate.



8A



8B

**Figure 8:** (A) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour test 1 (40%; 7g). (B) Biomass of the fungus *Ceratocystis fimbriata* during the solid state fermentation of cassava rind flour test 5 (35,9%; 10 g).

The influence of moisture discussed in Figure 6 demonstrates the behavior microorganism in Figure 8A where gas exchange were quite limited damaging microbial respiration resulting in a sharp drop in biomass rate. It also demonstrates the behavior in Figure 8B where a small amount of inoculum added in a large amount of mass makes inefficient use of this substrate influencing the growth of microorganisms.

#### 4- Conclusion

The cassava rind flour without added nutrients is a suitable substrate for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. The best condition was achieved with 50 % moisture in a mass of 14,23 g of dry matter in 48 h fermentation. The total concentration of volatile was 91, 92  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . This result shows that obtaining ethyl acetate in this study was quite favorable compared to others, since no type of nutrient solution was not added to the residue, and neither was used a complex methodology to recovery of the aroma, i.e., without the use of solvents. Planning shows that the adjustments between the moisture content and the mass used are needed in order to increase production of the compound ethyl acetate, enhancing the prospects for this process.

## 5- References

Christen, P., Meza, J. C., & Revah, S. (1997). Fruity aroma production in solid-state fermentation by *Ceratocystis fimbriata*: influence of the substrate type and the presence of precursors. *Mycological. Research*, 101, 911-919.

Christen, P.; Bramorski, A.; Revah, S.; Soccol, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresource Technology*, v. 71, p. 211-215, 2000.

Ferreira, M.S; Silva, J.R.B. Utilização da casca, entrecasca e raspa da mandioca na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, v.1, n.2., p.64-66, Dezembro, 2011

IAL — Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz 3rd, IMESP, São Paulo, 1985.

Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Freitas, R. J. S., Christen, P., & Soccol, C. R. (2000). Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 33-39.

Medeiros, A. B. P., Christen, P., Roussos, S., Gern, J. C., & Soccol, C. R. (2003). Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 245-248.

Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Vandenberghe, L. P. S., Pastore, G. M., & Soccol, C. R. (2006). Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. *Food Technology Biotechnology*, 44, 47-51.

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.

Mitchell, D. A.; Berovic, M.; Nopharatana, M.; Krieger, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006a.

Nascimento Filho, W. B; Franco, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, XX (XX), *no prelo*. Data de publicação na Web: 3 de julho de 2015.

Neto, S.F.C; Zeoula, L.M; Branco, A.F; Prado, I.V; Santos, G.T; Fregadolli, F.L; Kassies, M.P; Dalponte, M.O. Mandioca e Resíduos das Farinheiras na Alimentação de Ruminantes: Digestibilidade Total e Parcial. *Rev. bras. zootec.*, 29(6): 2099-2108, 2000.

Nunes, R.M; Guarda, E.A; Serra, J.C.V; Martins, A.A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

Oliveira, L.C; Santos, J.A.C; Narain, N; Fontes, A.S; Campos, R.S.S; Souza, T.L. Caracterização e extração de compostos voláteis de resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência Rural*, v.42, n.12, dez, 2012.

Pattanaik, B. N.; Mandalia, H. C. Ethyl acetate: properties, production processes and applications - a review. *International Journal of Current Research and Review* 01/2011; 3(12):23-40.

Rossi, S. C., Vandenberghe, L. P. S., Pereira, B. M. P., Gago, F. D., Rizzolo, J. A., Pandey, A., Soccol, C. R., & Medeiros, A. B. P. (2009). Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Research International*, 42, 484-486.

Silva, J.S., Santos, S. da S., Gomes, F. G. G. G. A biotecnologia como estratégias de reversão de áreas contaminadas por resíduos sólidos. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET* e-ISSN 2236 1170 - V. 18 n. 4 Dez 2014, p.1361-1370 Recebido em: 23.07.14 Aceito em: 25.11.14.

Soares, M.; Christen, P.; Pandey, A.; Soccol, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 35:857-861, 2000

Tamanini, C; Hauly, M.C. de O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, out./dez. 2004.

Uenojo, M., & Pastore, G. M. (2006). Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 509-515.

Urit, T., Loser, C., Wunderlich, M., & Bley, T. (2011). Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 34, 547-559.



## EVALUATION OF ETHYL ACETATE RECOVERY USING NaCl WITH DIRECT APPLICATION IN STUDY OF INCREASE SCALE THROUGH THE FERMENTATIVE PROCESS IN STATE SOLID.

K.B. ARAÚJO<sup>a,\*</sup>, R.C.A. SANTOS<sup>a</sup>, F. C. DAMASCENO<sup>b</sup>, G. F. DA SILVA<sup>c</sup>, A. M. LIMA<sup>d</sup>, R. R. SOUZA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemical Engineering, Federal University of Sergipe

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Federal University of Sergipe

<sup>c</sup>Department of Oil and Gas, Federal University of Sergipe

<sup>d</sup>Department of Chemical Engineering, Federal University of Sergipe, FAPITEC/CAPES.

\*Corresponding author. Tel.: +55 79 98552120; +55 79 91387838. E-mail address: [kyzzesbarreto@hotmail.com](mailto:kyzzesbarreto@hotmail.com) (K.B. ARAÚJO)

### ABSTRACT

The use of waste as flour of cassava rind as the sole source of carbon and nutrients in conducting of fermentation processes using species *Ceratocystis fimbriata* aims to reduce process cost. The forms of recovery and to scale-up of the process initiated in bench are one of the challenges during the fermentation process. The aim of this study was to evaluate sodium chloride of concentration (NaCl) for the recovery of ethyl acetate and vary bench scale using better saline concentration to recover compound. For the recovery of the ethyl acetate, the experiments were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks, which were added 14.23 g of mass substrate with 50% moisture and after 48 h of fermentation was carried out the centrifugation from residue with various concentrations of saline. For the scale-up, the experiments were conducted in Erlenmeyer flasks 1000 ml (10%, 20%, 30% inoculum) and 2000 ml (50% inoculum) incubated at 28 C for 48 h. Chromatographic analysis has detected that the saline solution 30% was best in the recovery ethyl acetate and this concentration was used to recover the compound in increasing scale. The 1000ml Erlenmeyer flask with 30% inoculum got better ethyl acetate content (19, 38  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Keywords: solid state fermentation, *Ceratocystis fimbriata*, saline solution, recovery of ethyl acetate, increasing scale

## 1-Introduction

Through the development of industrial biotechnology processes various opportunities are emerging for the economic utilization of agro-industrial wastes such as cassava bagasse, which is a fibrous material that contains between 30% and 50% starch on a dry basis. Its rich organic matter and low ash content, can serve as an ideal substrate for microbiological processes for the production of high-value products such as ethanol, single cell protein (SCP), mushrooms, enzymes, organic acids, amino acids, flavorings, etc (Pandey *et al* 2000).

One the possible application is the use of microorganisms such as yeast and fungi, using starch as substrate for the production of aromatic compounds such as ethyl acetate, which is widely used with an annual output of about 1,5 million tons and its volatile allows the product recovery process is energetically more favorable in comparison with the recovery of the ethanol by rectification (Pandey *et al* 2000; Urit *et al.*, 2011; Löser *et al.*; 2013).

Filamentous fungi like *Ceratocystis fimbriata* has a great potential for ester synthesis, grows rapidly, have good sporulation capacity and produces a variety of fruity aroma depending on the culture conditions which can be widely implemented in processes based on fermentation liquid and solid state fermentation (Pandey *et al.*; 2000; Sanchez *et al.*; 2002; Rossi *et al.*; 2009).

However, the recovery of ethyl acetate is often complicated step in the production of flavors due to its volatility, low solubility and different polarity. One of the methods most used for removal of organic compounds from the fermentation medium is the extraction with solvent, separation membranes and specific adsorption on activated carbon and steam distillation (Medeiros *et al.*; 2006).

The use of salts for recovering the volatile compound increases the solubility improving the productivity of extracts also is a quick and simple method of sample preparation, low cost, recovery without loss and without the use of toxic organic solvent (Skoog *et al.*; 2002).

The Commercial Production of volatile compounds in solid state fermentation utilizing alternatives substrates faces difficulties in information to more precise information on the expansion of scale and product recovery techniques. The results of

these fermentative processes when they are found in appropriate economic conditions bench scale operation, there is the necessity of extending the scale of production to an industrial scale. The variation of lower production scale to a larger scale is known as increased scale or "scale-up" (Branco *et al.*; 2010).

The expansion stage should provide a fermenter which provides lower cost, good heat transfer and mass, mainly of oxygen, rapid aseptic procedures and easy homogenization. It is not a simple task, mainly by reason of many uncertainties associated with the scale-up and the inherent difficulties, satisfactory requirements are rather found in small-scale fermenters due to ease of operation (Lonsane *et al.*; 1992).

The aim of this work is to apply saline solution of sodium chloride (NaCl) in the recovery of ethyl acetate produced by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation varying the bench scale using cassava rind flour as substrate without nutrient additions.

## **2 Material and methods**

### **2.1 Microorganism and inoculum**

*Ceratocystis fimbriata* 1271, acquired from culture collection André Torsello Foundation (Campinas - São Paulo - Brazil), was grown and periodically transferred to Saboraud Ágar. A spore suspension was prepared after a 5-day culture at 28°C in petri dish. Spores were collected with malt extract. The spore suspension contained  $1 \times 10^6$  spores.mL<sup>-1</sup>, as determined using the Neubauer's chamber.

### **2.2 Substrate preparation**

Cassava rinds were oven dried at 60 °C for 08 h. The dried substrates were then milled and sieved to obtain particles of 0.82 mm size. To test the recovery of acetate, the assay was performed in 250 ml Erlenmeyer flask that contains 14,23 g of cassava rind flour. In the preparation of assays to test the increased scale were used Erlenmeyer flasks 1000 and 2000 ml, which contained 56,04 g and 113,85 g, respectively, of cassava rind flour. All flasks were sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes.

### **2.3 Fermentation procedure**

After sterilization the residue was cooled, for recovery of ethyl acetate the substrate was moistened with volume of water which corresponds the applied moisture (50% moisture- 1mL inoculum) in 250 mL erlenmeyer flasks. The procedure for conducting the study by increased scale, the fermentation varied according to the size of the flasks. For the a 1000 mL erlenmeyer flask was used 10% (4.7 mL), 20% (11 mL) and 30% (16 mL) inoculum. And for the 2000 mL erlenmeyer flask used 50% (32 mL) inoculum. All the flasks were incubated at 28° C for 48 h.

### **2.4 Analytical procedures**

The residues were centrifuged at 3400 rpm for 10 minutes with a saline solution. In flasks of 250ml, various concentrations of NaCl were tested for separation of the aroma in the biomass through the centrifugation in a concentration of 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% and 35% in order to evaluate which the salt concentration that facilitated the release of volatile compound from inside the biomass. And after the result of the best concentration of salt for separating bioaroma, the 1000 ml and 2000 ml of erlenmeyers flask were centrifuged with better efficient saline solution for extraction. For all tests, 5 mL of the supernatant were transferred into headspace vial to carry out the chromatographic analysis. All experiments were carried out in triplicate.

### **2.5 Chromatographic Analysis**

Ethyl acetate was measured in the headspace of the culture by gas chromatography (GC) analysis performed, Shimadzu, GC 2010. The model was used RTX -5 column (30 m length x 0.32 mm diameter x 0.1 nm thick) with automatic injector Shimadzu , model AOC -5000 . The injections were performed automatically with the headspace method, and injection volume of 750 µL and a 1:10 split ratio. The carrier gas was helium (99,999% pure) at a flow of 1 mL.min<sup>-1</sup>. The oven temperature was programmed: initiation at 60 °C initially, increased at a 5 °C. min<sup>-1</sup> to 80 ° C and then 20 ° C.min<sup>-1</sup> to 150 °C (Medeiros et al., 2006). Before injection, the sample was stirred at 600 rpm for 10 minutes at 60 °C. The temperature of the syringe was 80 °C. The standard curve was used to identify microbial aroma compound.

### **3 Results and discussion**

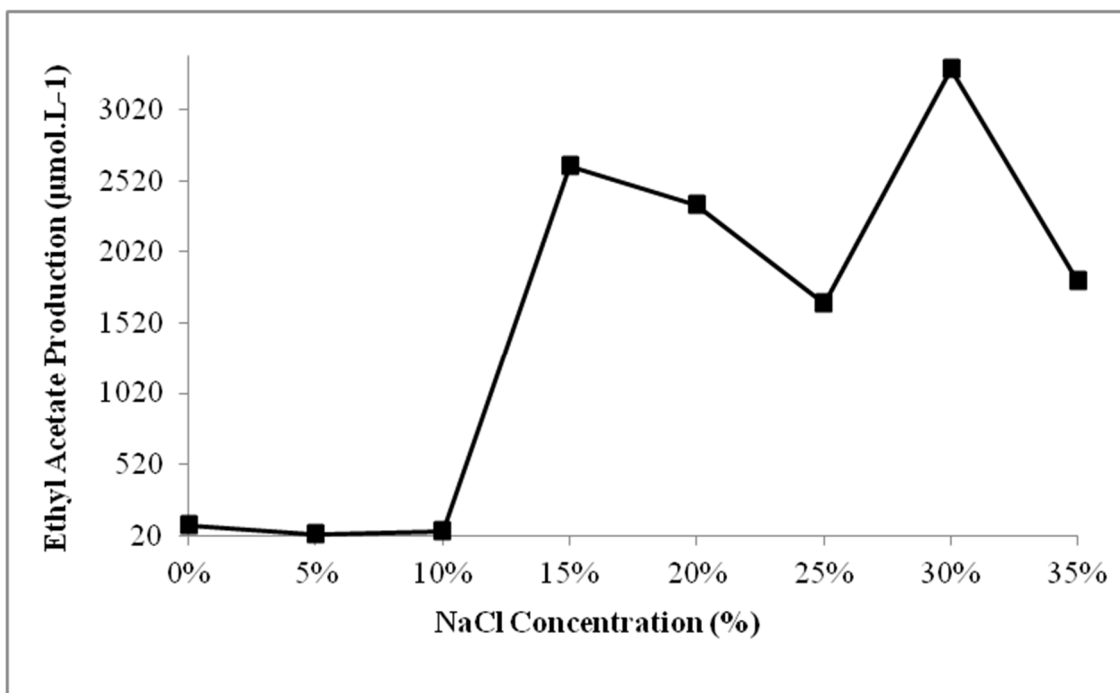
The products obtained from solid-state fermentation using larger scales than those used in laboratory trials is a challenge.

The initial experiments conducted in small flasks of 250 mL, for example, lead to results which reflect the specific process conditions such as moisture, substrate mass and quantity of inoculum that are related to environmental conditions of the reactor used.

#### **3.1- Recovery of the ethyl acetate with NaCl**

The recovery experiments of compound with NaCl concentrations shown in Figure 1 indicate that values above 15% NaCl increased recovery of the compound of substrate to more than 100 times in relation to the amounts obtained at values of 5 and 10%.

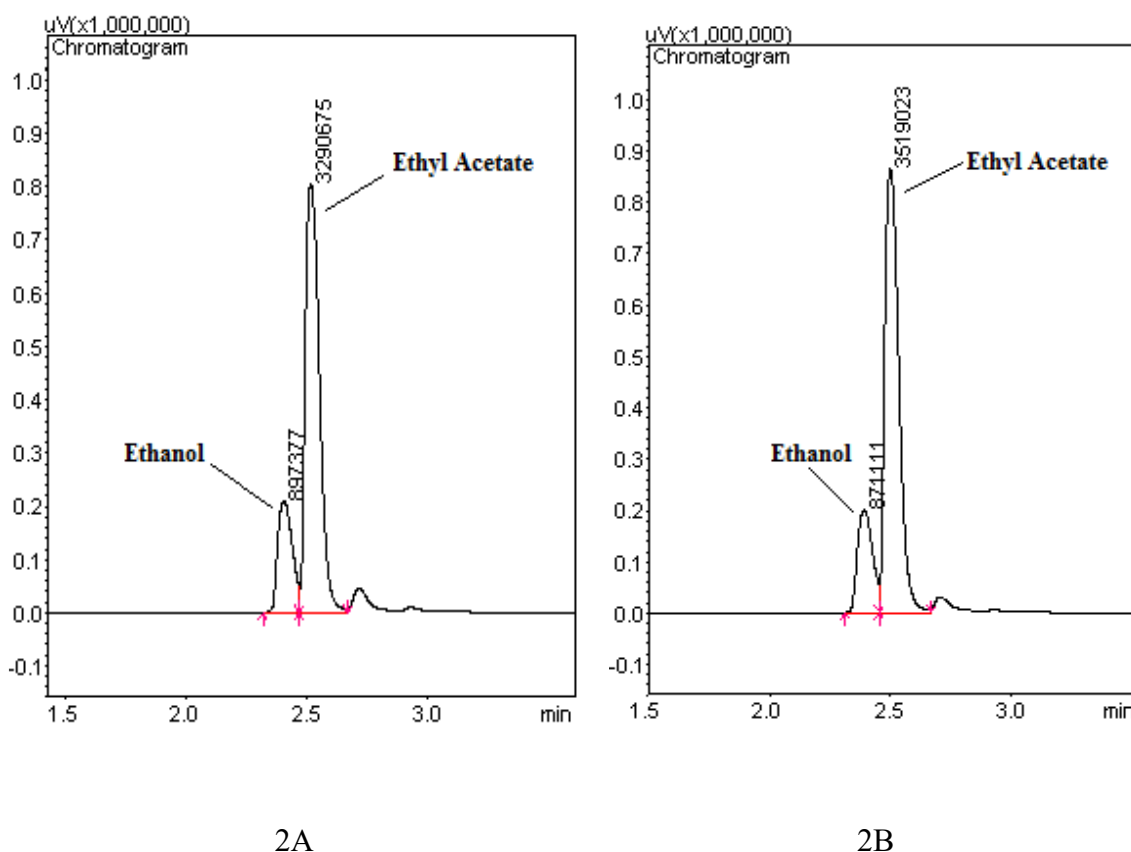
In this aspect the concentration of 30% NaCl had a greater recovery of ethyl acetate (3303,60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) corresponding to a yield of 232,16  $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{g}^{-1}$ . This occurs because the addition of salt increases the sensitivity of extraction, i.e., salt ions in high concentrations causes the competition at the composed by the water reducing their solubility facilitating the release of the compound from the inside of the biomass and increases productivity of the extract. Already at a concentration of 35% NaCl there was a reduction in acetate content, because the increase in ion concentration may have caused a decrease in water activity reducing interactions of the molecules with ethyl acetate influencing the solubility thereof. The Figure 1 shows the results of recovery of ethyl acetate with different concentrations of NaCl in 48 h of fermentation.



**Figure 1:** Recovery of ethyl acetate with different concentrations of NaCl.

Salt concentrations between 1 and 30% have been used in analysis of aqueous samples. The increase in the ionic strength causes reduction at the solubility of analyte in matrix, facilitating its extraction, however, this effect is not general and depends on the polarity of analito, the salt concentration and the sample matrix. In some cases that encompasses highly polar analytes or liable to undergo ionic dissociation in aqueous medium, this increase in ionic strength can cause the opposite effect and cause a decrease in extraction efficiency (LORD et al 2000; THEODORIS et al 2000).

The chromatograms related the recovery of the ethyl acetate without salt and with NaCl 30% solution are shown in Figure 2.



**Figure 2:** Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF erlenmeyers 250 ml without salt (2A), 250 ml with 30% salt (2B).

Rossi et al (2009) tested the effects of the citrus pulp supplemented with various carbon sources and adding saline ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,64-7,36  $\text{g.L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , 0,16-1,84  $\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{MgSO}_4$  0,36-6,36  $\text{g.L}^{-1}$  for the production of volatiles. The best condition was achieved when PC was supplemented with 50% soybean meal (3.8% nitrogen), with 25% of sugarcane molasses (11.3% of reducing sugars) and saline solution (2  $\text{g L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5  $\text{g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  and 1  $\text{g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ). The total concentration of volatiles was around 100 mmol / L g. Smith et al (2000) tested the coffee husk treated with the addition of glucose (20, 35 and 46 g: 100 g DM) about the production of volatile compounds, and also the effect of the addition of some possible precursors: leucine (10 mmol), soybean oil (10%, v: w) and saline solution. They realized that addition leucine improves production by 58%, mainly ester production, but the addition of a solution of a mineral salt was unnecessary.

It is noteworthy that in the experiments above all substrates were supplemented with nutrient solution, which differs from the present study.

### 3.2 Study of increased scale for ethyl acetate production.

The salt concentration corresponding to the biggest recovery was used in increased scale trials varying mass and inoculum rate in accordance with the size of the Erlenmeyer. The Table 1 shows the productivity results of ethyl acetate in 48 h of fermentation where the highest production was obtained.

**Table 1:** Values of ethyl acetate productivity related to inoculum rate and container volume.

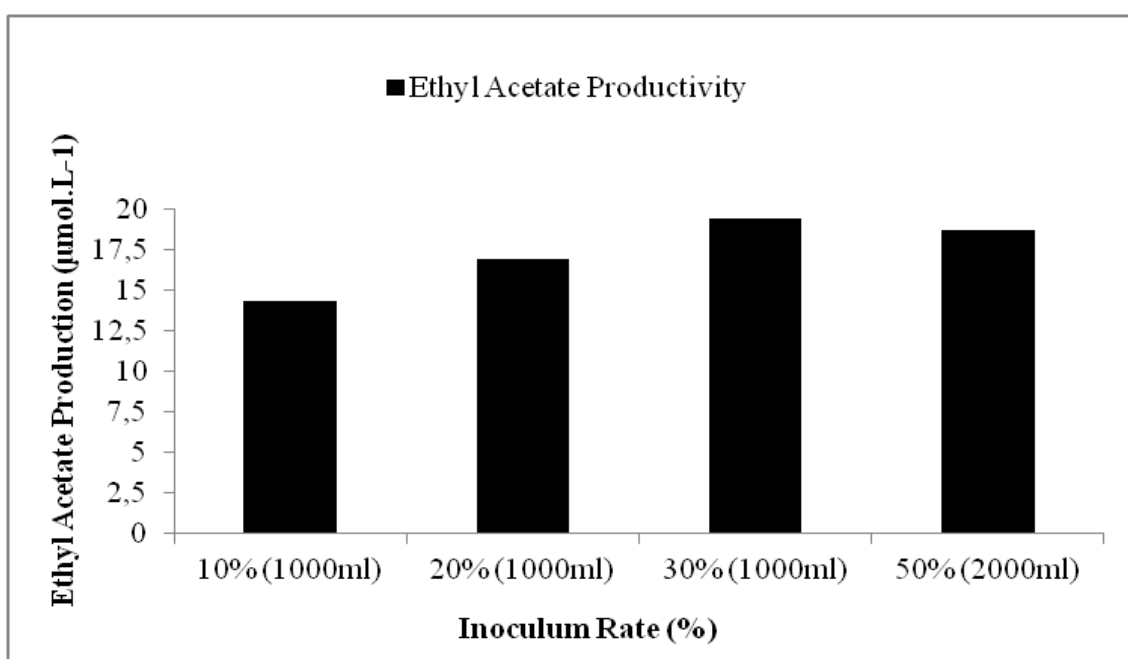
| <b>250 ml Erlenmeyer</b>  |   |
|---------------------------|---|
| Inoculum rate (%)         | Ethyl acetate productivity ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) |
| 10                        | 3303,60   |
| <b>1000 ml Erlenmeyer</b> |   |
| Inoculum rate (%)         | Ethyl acetate productivity ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) |
| 10                        | 14,29   |
| 20                        | 16,89   |
| 30                        | 19,38   |
| <b>2000 ml Erlenmeyer</b> |   |
| Inoculum rate (%)         | Ethyl acetate productivity ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) |
| 50                        | 18,70   |

The production of ethyl acetate in fermentations conducted in Erlenmeyer flasks of 1000 ml and 2000 ml considering the proportion of the amount of mass used in assays in a 250 mL Erlenmeyer flask and 50% moisture was influenced by the percentage of inoculated microorganisms. However the production of the metabolite in larger flasks (1000 ml and 2000 ml) was lower than that obtained in 250 mL flasks, this may be explained by environmental conditions proportionate for each container used as a reaction vessel, because the largest flasks containing an air volume above the mass of substrate rapidly reduce the necessary moisture present to establish the optimum oxygen transfer to the metabolic pathway of the production of ethyl acetate be favored. All this



is influenced by heterogeneity of a larger reactor that provides varied conditions to the microorganisms as it may get exposed to small variations in pH, temperature, dissolved oxygen concentration along the height of the fermenter, a fact complicated to be predicted on a smaller scale.

Thus, the results indicate that both the lack of oxygen, as the excess oxygen impair the formation of ethyl acetate due to this some processes becomes necessary the presence of air humidifiers before the introduction thereof to reactor for better transfer oxygen. The Figure 3 shows the behavior of the productivity of ethyl acetate in larger flasks for 48 h fermentation.

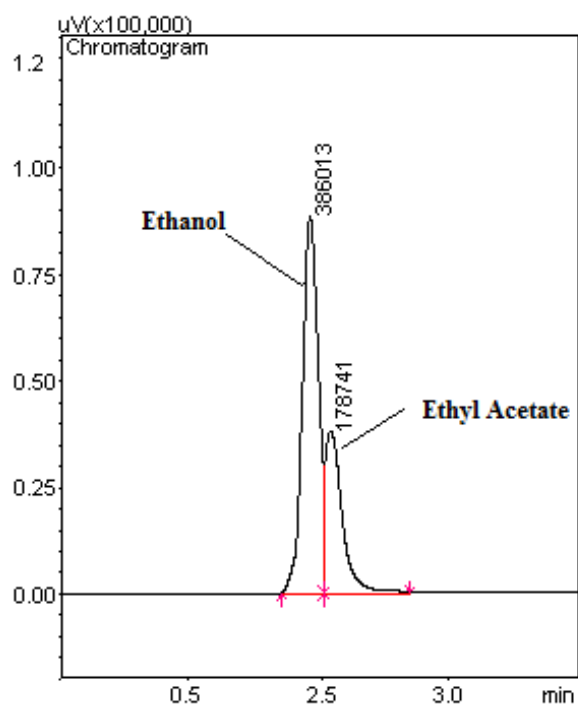


**Figure 3:** Ethyl acetate production in different erlenmeyers and quantity of the inoculum.

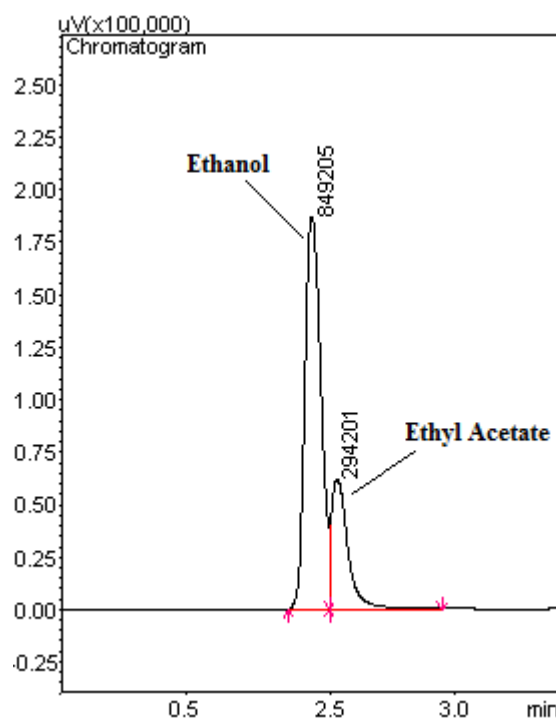
It is observed through the Figure 3 that greater productivity were reached within 30% of inoculum in flasks of 1000 mL and this can be due to the amount of water and inoculum added in the substrate has created a surface film of water facilitating dissolution and mass transfer of nutrients and oxygen. Different from the others experiments that was unfavorable for the production of acetate, as it the amount of moisture added in a large amount of mass was not sufficient to produce the compound because there was difficulty in diffusion of nutrients resulting in lower growth of micro-organism than possible and expected. Other factor for the productivity in 2000 mL flasks to be reduced is the influence of the oxygen concentration, because the results show that excess of this impairs formation of ethyl acetate due to inhibition of cell

growth by the generation of reactive species, as well as free radicals which could create a condition of oxidative stress. These agents are responsible for inhibition of DNA synthesis and, consequently, by changes in the cell metabolism. Already the lack of oxygen occurs the minimum accumulation of ester and little ethanol will be used in the conversion process.

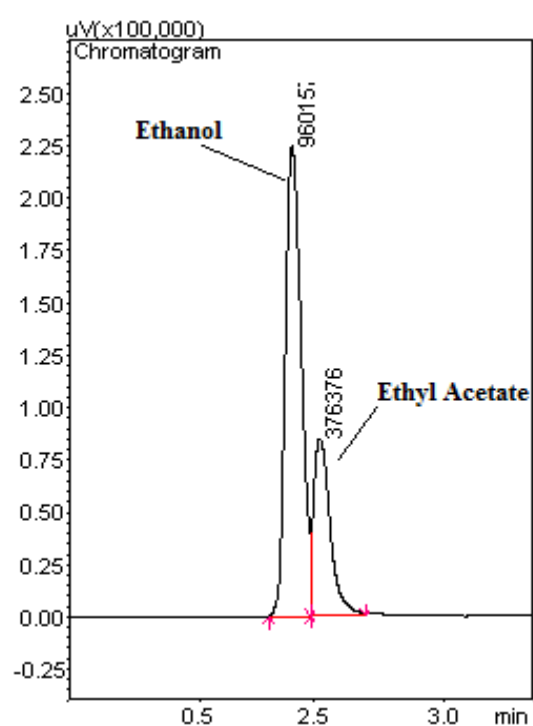
The chromatograms related the ethyl acetate productivity in larger flasks are shown in Figure 4.



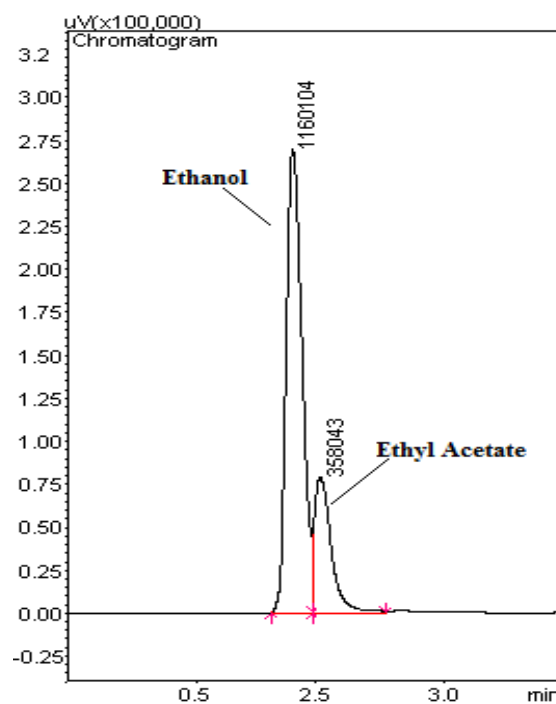
4A



4B



4C



4D

**Figure 4:** Chromatogram production of ethyl acetate by the headspace method produced in cassava rind flour in SSF erlenmeyers 1000 ml – 10% (4A), 1000 ml – 20% (4B), 1000 ml – 30% (4C) e 2000 ml – 50% (4D).

The formation of ethanol occurs in anaerobic process and the conversion of ethanol in ethyl acetate is limited by the concentration of oxygen present in the environment. Since the reactions are reversible and will depend on the concentration in the dissolved nutrient medium, the ethanol will be oxidized to acetaldehyde and, consecutively, in ethyl acetate. However, if ideal concentrations of oxygen are present, occurs the formation of acetyl-CoA.

#### **4- Conclusion**

The use of sodium chloride in the recovery of compound (ethyl acetate) afforded high values (yield 232.16  $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{.g}^{-1}$ ) pointing out that their use is feasible thus reducing the possible environmental impact on waste generated in the fermentation.

However, according to the conditions used in a study conducted in larger reaction vessels (flasks 1000 and 2000 mL), considering the increase in bench scale, it is necessary same performance as observed at smaller scales (Erlenmeyer 250 ml), if this objective should not be achieved to test a new criterion as slightly modify the fixed greatnesses, in order to improve process performance. It is the case of this study, because a smaller scale production was most advantageous since larger-scale production was not so promising.

To reverse this situation, it is necessary to better define certain criteria for expanding the parameters involved (moisture, inoculum rate) in order to improve process performance.

## 5- References

Branco, L.S.C; Almeida, M.M.T; Caetano, T.M; Pinto, G.A.S; Azeredo, H.M.C. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por *Rhodotorula* sp. Cnpq-02 em processo batelada para obtenção de carotenoides. COBEQ 2010 – XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Anais em CD, p. 6926-6934, ISSN 2178-3659, Foz do Iguaçu/PR, Setembro de 2010.

Lonsane, B.K; Saucedo-Castañeda, G; Raimbault, M; Roussos, S; Viniegra-Gonzalez, G; Ghildyal, N; Ramakrishna, M; Krishnaiah, M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochem.* 27: 259-213. 1992.

Lord, H.; Pawliszyn, J. Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A*, v. 902, p. 17-63, 2000.

Löser, C; Urit, T; Stukert, A; Bley, T. Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *Journal of Biotechnology.* 163. 17– 23. 2013

Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Vandenberghe, L. P. S., Pastore, G. M., & Soccol, C. R. (2006). Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. *Food Technology Biotechnology*, 44, 47-51.

Pandey,A; Soccol, C.R; Nigam, P; Soccol, V.T; Vandenberghe, L.P.S; Mohan, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology* 74 (2000) 81±87.

Rossi, S. C., Vandenberghe, L. P. S., Pereira, B. M. P., Gago, F. D., Rizzolo, J. A., Pandey, A., Soccol, C. R., & Medeiros, A. B. P. (2009). Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. *Food Research International*, 42, 484-486.

Sanchez, L; Seila, R.L; Christen, P; Revah, S. Effect of leucine on aroma volatiles production from *Ceratocystis fimbriata* grown in liquid culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 231–237, 2002.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Numan, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 836, 2002.

Soares, M.; Christen, P.; Pandey, A.; Soccol, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 35:857-861, 2000

Theodoris, G.; Koster, E.; Jong, G. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *Journal of Chromatography A*, v. 475, p. 49-82, 2000.

Urit, T., Loser, C., Wunderlich, M., & Bley, T. Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 34, 547-559. 2011.

# COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE JUNTO AO INPI

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PROTOCOLO SEMA  
28/04/2016 036160000024  
16:05 RESE  
BR 10 2016 009544 1

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

DIRPA

Tipo de Documento:

Formulário

DIRPA

Página:

1/3

Título do Documento:

Depósito de Pedido de Patente

Código:

FQ001

Versão:

2

Procedimento:

DIRPA-PQ006

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

1.2 Qualificação: PESQUISA

1.3 CNPJ/CPF: 13.031.547/0001-04

1.4 Endereço Completo: AV. MARECHAL RONDON, S/N, ROSA ELZE, SÃO CRISTÓVÃO, SE

1.5 CEP: 49100-000

1.6 Telefone: 79 2105-6687

1.7 Fax:

1.8 E-mail: RRSOUZA@UFS.BR

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção

☐ Modelo de Utilidade

☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA UTILIZANDO O MICRORGANISMO CERATOCYSTIS FIMERIATA E APROVEITANDO A FARINHA DE CASCA DE MANDIOCA COMO SUBSTRATO

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N°

Data de Depósito:

5. Prioridade: ☐ Interna (66)

☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito

Numero do depósito (se disponível)

Data de depósito

☐ continua em folha anexa



## RELATÓRIO DESCRITIVO

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA UTILIZANDO O MICRORGANISMO *Ceratocystis fimbriata* E APROVEITANDO A FARINHA DE CASCA DE MANDIOCA COMO SUBSTRATO.

### CAMPO DA INVENÇÃO

001 A presente invenção refere-se à produção de um bioaroma através da fermentação em estado sólido utilizando o microrganismo *Ceratocystis fimbriata* cultivado na farinha casca de mandioca. O processo fermentativo do resíduo foi conduzido da seguinte forma: lavagem e secagem da casca de mandioca, moagem, esterilização, resfriamento, inoculação, fermentação e centrifugação.

### FUNDAMENTAÇÃO DA INVENÇÃO

002 Os resíduos agroindustriais são produzidos amplamente no mundo com o aumento da população mundial e esses resíduos são gerados a partir do beneficiamento de produtos vegetais e do processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar e álcool e outros, sendo sua produção, geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima.

003 A casca da mandioca é um desses resíduos gerados em função do processo tecnológico adotado durante o início da fabricação da farinha de mandioca, sendo constituído de casca, entrecasca e pontas de mandioca. O destino desses rejeitos é comumente eliminado no meio ambiente gerando um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza.

004 Com a finalidade de reduzir esse impacto negativo ao meio ambiente, os resíduos gerados poderiam ser utilizados como fontes alternativas de nutrientes através do desenvolvimento de processos biotecnológicos possibilitando a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, como por exemplo, a produção de bioaroma em condições controladas de fermentação, como uma boa alternativa para o aproveitamento de resíduos.

005 Os aromas são utilizados amplamente como realçador de sabor na indústria de alimentos, nas indústrias farmacêutica, cosméticos e agroindustrial e a síntese de compostos aromatizantes vêm sendo crescente devido à substituição gradativa de aromas sintéticos pelos de origem biotecnológica, identificado como “naturais” criando maiores oportunidade para novas pesquisas.

006 A produção de bioaromas por processos biotecnológicos pode ocorrer por via fermentativas com uso de substratos simples e uma cultura microbiana (fungos, leveduras ou bactérias) que consomem os nutrientes presentes no substrato resultando a produção de uma mistura de centenas de substâncias voláteis representantes de várias classes químicas, como terpenos, aldeídos, lactonas, alcoóis, ésteres e outras moléculas complexas resultantes do metabolismo de fungos, leveduras e bactérias. Entre vários ésteres, estão o acetato de hexila, acetato de isoamila e acetato de etila, que é largamente empregado em essências artificiais de frutas, como realçador de aromas e como solvente em geral nos laboratórios químicos que é bastante favorecida devido ao seu baixo custo, baixa toxicidade e odor agradável.

007 Visando a avaliar o potencial biotecnológico do resíduo agroindustrial mais produzido no estado de Sergipe, desenvolveu-se a presente invenção com o intuito oferecer à população um produto natural com custo reduzido, além de minimizar possíveis impactos ambientais que poderiam ser provocados pelos resíduos. A produção de acetato de etila através da fermentação em estado sólido da farinha casca de mandioca, sem adição de nutrientes, utilizando o microrganismo *Ceratocystis fimbriata* com o intuito de aplicar em processos industriais.

008 Dentre as buscas realizadas nos bancos de dados de patentes pesquisadas constatou que geralmente o acetato de etila é produzido através de processos e substâncias químicas enquanto o presente invento produz este bioaroma por uma rota mais simples, com baixo custo e menos poluente aproveitando somente o potencial biotecnológico do resíduo.

## **DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

009 Esta invenção refere-se à produção de um biocomposto aromático através da fermentação em estado sólido, sem adição de solução nutriente, na casca de mandioca utilizando o microrganismo *Ceratocystis fimbriata*. A fermentação do resíduo foi realizada nas seguintes etapas: lavagem e secagem da casca de mandioca, moagem, pesagem, esterilização, resfriamento, inoculação, centrifugação e evaporação.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

0010 A FIGURA 1 representa a visão geral do processo de preparação e fermentação em estado sólido com a casca de mandioca.

0011 Inicialmente foi necessário realizar uma lavagem (1) na casca da mandioca para a retirada de resíduos sólidos com a finalidade de evitar a contaminação e não implicar nas etapas posteriores alterando os resultados. Em seguida, foi realizada a

secagem (2) do resíduo para a retirada total da água e procedeu-se a moagem (3) para a transformação da casca de mandioca em farinha. Após a moagem, a farinha da casca de mandioca passou pelo processo de esterilização (4), a 121 °C por 15 minutos e após o resfriamento (5) do meio estéril procedeu-se à inoculação (6) para iniciar o processo de fermentação (7). Em seguida, o fermentado foi centrifugado (8) para realizar a separação do precipitado ao sobrenadante. O precipitado (9) foi aproveitado para realizar a determinação da biomassa fúngica e o sobrenadante (10) foi utilizado para extrair o acetato de etila através do processo de evaporação (11).

0012 O processo de fermentação sólida para a obtenção do bioaroma acetato de etila iniciou com o processo preparo do resíduo, em que somente as cascas de mandioca foram lavadas em água corrente para a retirada total da areia e outros contaminantes que possam influenciar negativamente no processo de fermentação. Em seguida, as cascas foram submetidas a um processo de secagem em um secador elétrico com circulação de ar a 60° C por 08 horas para remoção da água no material sólido evitando o crescimento de microrganismos e facilitar na obtenção da farinha da casca de mandioca. As cascas secas foram moídas numa granulometria 0,82 mm, com o objetivo de se obter um substrato farináceo mais adequado para produção de aromas pelo microrganismo. Em seguida, a farinha foi esterilizada numa autoclave a 121 °C por 15 minutos para inibir os compostos inibitórios presentes no resíduo. Finalizando o processo de esterilização, o resíduo estéril é resfriado antes de ser inoculado, pois seria um meio letal para o microrganismo.

0013 O inóculo consistiu no preparo de uma solução de extrato de malte em frascos de erlenmeyer 50 ml contendo o *Ceratocystis fimbriata* na concentração preferencialmente de 10<sup>6</sup> esporos/mL. Os frascos foram mantidos em shake numa velocidade de agitação de 100 rpm durante 48 hs. Após esse tempo, ocorre a inoculação que consiste em umedecer o resíduo com volume de água que corresponde a umidade aplicada de acordo com o planejamento experimental e 1 ml de suspensão de esporos contendo 10<sup>6</sup> esporos/mL, os erlenmeyer inoculados de 250 ml foram incubados a 30°C. Vale acrescentar que com o objetivo de avaliar o potencial do resíduo não foi adicionado nenhum tipo de solução nutriente e o teor de umidade da fermentação em estado sólido é estipulado em função do poder de absorção do substrato.

0014 Para avaliar a produção do acetato de etila na farinha casca de mandioca, a fermentação ocorreu durante seis dias, e a cada 24 horas, um erlenmeyer era retirado da incubação e procedia-se à centrifugação do fermentado com água destilada numa

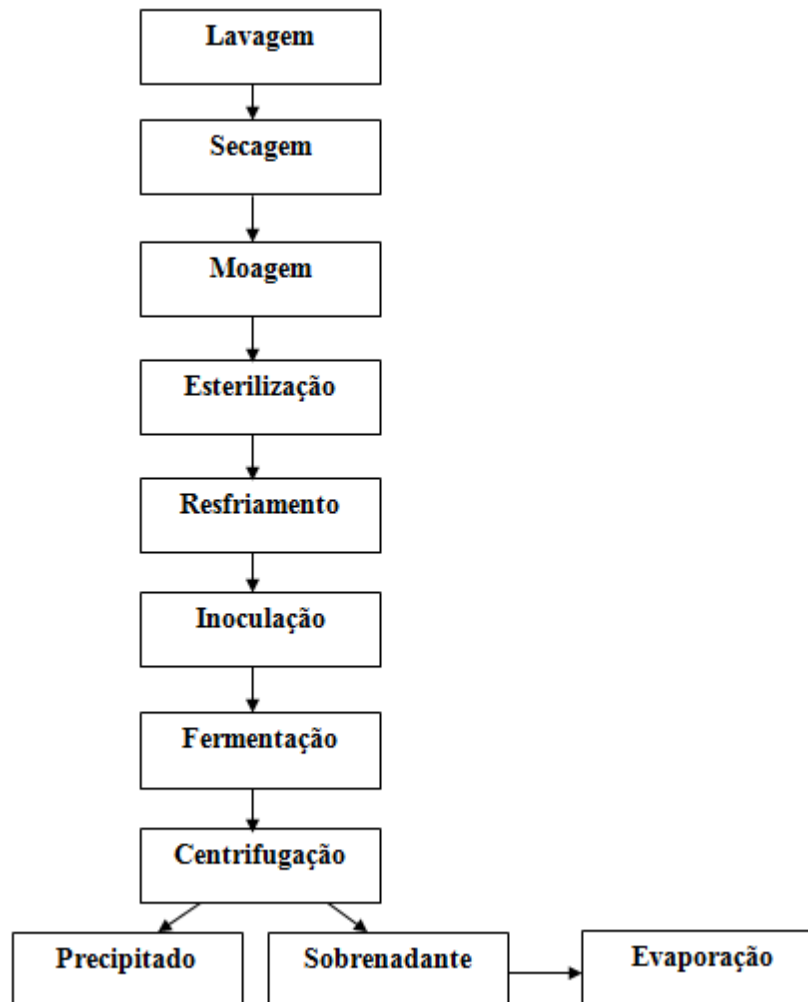
proporção 1: 2 a 3400 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante, coletava-se uma alíquota de 5 mL, em triplicata, transferia-se para um vial de headspace de 20 mL e armazenava em freezer, em torno de -20°C, até o momento de análise. Já todo o precipitado foi centrifugado duas vezes com água destilada e utilizado para determinar a biomassa fúngica quem foram colocadas em placa de petri e submetidas à secagem em estufa a 100°C por 24 horas até peso constante.

0015 Antes de realizar a análise de produção de acetato de etila, foi retirada uma pequena quantidade do fermentado para acompanhar o teor de umidade da amostra e determinar o consumo da matéria orgânica, pelo método do DNS. No melhor experimento foi realizado outra fermentação para separação do aroma na biomassa através da centrifugação utilizando NaCl numa concentração de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% e 35% com o intuito de avaliar qual a concentração salina que facilitou a liberação do composto volátil do interior da biomassa.

0016 Para a análise do acetato de etila no sobrenadante utilizou-se um cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC 2010. A coluna utilizada foi RTX-5 (30 m de comprimento x 0,32mm de diâmetro x 0,1 µm de espessura), com injetor automático da marca Shimadzu, modelo AOC-5000. As injeções foram realizadas pelo método do headspace automático, sendo o volume de injeção 750 µL e uma taxa de split de 1:10. O gás de arraste foi o Hélio, num fluxo de 1 mL/ min. A rampa de temperatura teve as seguintes condições: inicialmente a 60°C, aumentando a uma taxa de 5°C/min. até 80 °C e, em seguida, aumentando a uma taxa de 20°C/ min. até 150°C. Antes da injeção, a amostra era agitada a 600 rpm por 10 minutos a 60 °C. A temperatura da seringa era de 80 °C.

0017 Todo o procedimento realizado obedeceu a um planejamento experimental de onze experimentos que corresponde um planejamento experimental 2<sup>2</sup> ensaios acrescidos de 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, tendo como variáveis a massa da amostra e o teor de umidade. A massa da amostra variou entre 7 a 13 gramas, tendo 10 gramas como ponto central. Já a umidade variou entre 40% a 60%, sendo 50% o ponto central.

**FIGURA**



**FIGURA 1: Esquema de produção do acetato de etila para farinha da casca de mandioca através da fermentação em estado sólido.**

## REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA UTILIZANDO O MICRORGANISMO *Ceratocystis fimbriata* E APROVEITANDO A FARINHA DE CASCA DE MANDIOCA COMO SUBSTRATO caracterizado por constituir-se de um bioprocessos através da fermentação em estado sólido da farinha da casca de mandioca utilizando o microrganismo *Ceratocystis fimbriata*.
2. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo processo de fermentação em estado sólido realizado com farinha da casca de mandioca através das etapas: lavagem e secagem da casca de mandioca, moagem, esterilização, resfriamento, inoculação e centrifugação.
3. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo processo de lavagem ser realizado aplicando água tratada para a retirada total da areia.
4. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo processo de secagem ser feito em um secador elétrico com circulação de ar a 60° C.
5. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo processo de moagem ser executado numa granulometria de 0,82 mm.
6. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo processo de esterilização ser realizado utilizando a 121 °C por 15 minutos.
7. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo processo de resfriamento ser feito até a temperatura ambiente.
8. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado

pelo processo de inoculação do resíduo ser executado adicionando uma concentração de  $10^6$  esporos/mL de *Ceratocystis fimbriata*.

9. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo processo de incubação do fermentado ser realizado à temperatura ambiente.

10. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo processo de centrifugação ser realizado para separação do fermentado.

11. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela utilização do precipitado para determinar a biomassa fúngica.

12. PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela utilização do sobrenadante para concentrar o bioaroma por evaporação.

## RESUMO

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO EM ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DO AROMA ACETATO DE ETILA UTILIZANDO O MICRORGANISMO *Ceratocystis fimbriata* E APROVEITANDO A FARINHA DE CASCA DE MANDIOCA COMO SUBSTRATO.

A presente invenção refere-se à produção de um bioaroma através da fermentação em estado sólido utilizando o microrganismo *Ceratocystis fimbriata* cultivado na farinha casca de mandioca. O processo fermentativo do resíduo foi conduzido da seguinte forma: lavagem e secagem da casca de mandioca, moagem, esterilização, resfriamento, inoculação, fermentação e centrifugação. Esta invenção visa produzir o bioaroma acetato de etila aproveitando e avaliando o potencial biotecnológico da casca de mandioca, um dos resíduos agroindustrial mais produzido no estado de Sergipe. O processamento da mandioca, cuja principal finalidade é a obtenção de farinha e fécula, causa sérios problemas ambientais em função de sua disposição na natureza. Seu bagaço é composto pelo material fibroso da raiz, contendo parte da fécula, no processamento dessas raízes de mandioca para a obtenção da fécula e da farinha é gerados grande quantidade de película e de bagaço de mandioca que geralmente são descartados no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento resultando em um grande impacto ambiental. Nosso invento produz este bioaroma por uma rota mais simples, com baixo custo e menos poluente aproveitando somente o potencial biotecnológico do resíduo.



## CONCLUSÃO GERAL

A farinha da casca de mandioca apresentou-se um potencial biotecnológico para a produção do acetato de etila juntamente com o fungo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* que se mostrou promissor na conversão do substrato em um bioaroma de interesse industrial diante de condições simples de fermentação.

A aplicação do planejamento fatorial e da superfície de resposta mostrou que os parâmetros estudados, teor de umidade e massa do substrato, foram importantes na influência da produção do composto (acetato de etila), com uma maior relevância para a umidade.

O planejamento fatorial mostrou a maior concentração do composto em 48 horas de fermentação, num teor de 50% de umidade sobre uma massa de 14,23 g atingindo um valor de 91,91  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e a superfície de resposta indica que a influência da umidade foi mais pronunciado nos valores entre 50% e 65%, enquanto a massa de substrato utilizada nos ensaios com os valores que favorecem a produção do composto são duas regiões, que varia entre 5,5 g e 7 g, e valores de entre 14 g e 15 g.

O desafio para a fermentação em estado sólido é o aumento de escala diante dos produtos obtidos usando a escala de laboratório e a recuperação do composto volátil que seja simples, rápida, de baixo custo e sem a utilização de solventes orgânicos tóxicos. Dessa forma, neste trabalho foi realizado um teste de recuperação utilizando uma concentração de 30% de solução salina (NaCl) e o resultado obtido foi bastante promissor (3303.60  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Com este resultado, foi realizado um aumento de escala utilizando a concentração de 30% de solução salina, mas o resultado obtido não foi favorável, não com relação ao teor de sal utilizado para a recuperação, e sim devido a heterogeneidade do reator onde foi realizada a fermentação para o aumento de escala proporcionando condições variadas para os microrganismos, como variações no pH, na temperatura, na concentração de oxigênio dissolvido ao longo da altura do fermentador.

Diante desses resultados, é preciso definir melhor determinados critérios para expandir os parâmetros envolvidos (umidade, taxa de inóculo), a fim de aumentar a produção do composto de acetato de etila, melhorando as perspectivas para este processo.

Vale salientar que neste estudo não foi adicionado solução nutriente ao substrato enquanto todos os outros trabalhos realizam em seus processos fermentativos e isto torna um diferencial do que se ver na literatura. Desta forma o potencial biotecnológico do resíduo foi aproveitado pelos microrganismos, apenas com a fonte de carbono e nutrientes inerente ao resíduo e necessário para o desenvolvimento de uma fermentação sólida sem suplementação de sais nutrientes.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudos de pH ótimo, aeração e taxa de inóculo para produção de aromas com a cepa *Ceratocystis fimbriata*.
- Melhorar os valores de parâmetro estudado para ampliação de escala, inclusive a granulometria do substrato.
- Realizar medições das concentrações de oxigênio no meio fermentativo, avaliando a sua contribuição na produção de acetato de etila durante todo o processo.
- Realizar um estudo de enzimas envolvidas no processo de produção de aromas
- Desenvolver uma metodologia para quantificar aroma através de outras técnicas analíticas.
- Avaliação de perdas durante os processos de extração
- Encapsular o aroma produzido
- Avaliar a toxicidade do aroma produzido
- Estudar uma forma de reutilização do bagaço após a extração do aroma